



Corso di dottorato di ricerca in:

Alimenti e Salute Umana

Ciclo 31°

***RICERCA DEI FATTORI PREDITTIVI DI RISPOSTA AGLI INIBITORI
DELLE TIROSIN-CHINASI NELLA LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA***

Dottoranda

Giorgia Maccari

Supervisore

Prof. R. Fanin

Co-supervisore

Dr.ssa E. Toffoletti

Anno 2019

*È il tempo che tu hai perduto per la tua rosa
che ha fatto la tua rosa così importante*

(Antoine de Saint-Exupéry, *Il piccolo principe*)

RIASSUNTO:

La Leucemia Mieloide Cronica (LMC) è una neoplasia che si origina dalla trasformazione clonale di una cellula staminale emopoietica. Essa è caratterizzata dalla presenza del cromosoma Philadelphia, una anomalia citogenetica, che provoca la produzione del gene di fusione BCR-ABL che codifica per una tirosin-chinasi costitutivamente attivata, causativa della patologia. Questa scoperta ha permesso l'introduzione degli inibitori delle tirosin-chinasi (TKI) di prima generazione (Imatinib) e di seconda generazione (Dasatinib e Nilotinib) che ha rivoluzionato la gestione e le prospettive dei pazienti affetti da questa patologia. I maggiori studi sulle LMC hanno evidenziato che il raggiungimento di una risposta profonda e rapida a questi farmaci rappresenta un fattore prognostico molto importante per l'outcome dei pazienti e per un eventuale futura sospensione del trattamento. Per questo motivo, attualmente, il raggiungimento di una risposta molecolare profonda e precoce è il principale target della ricerca nell'ambito della terapia della LMC con TKIs, anche alla luce degli alti costi dei farmaci di seconda e terza generazione. Pertanto abbiamo deciso di ricercare possibili fattori precoci predittivi della risposta ai TKIs in modo da poter indirizzare precocemente il clinico verso il trattamento che può offrire per ciascun paziente il miglior outcome.

Abbiamo, quindi, indagato marcatori che fossero rapidamente disponibili per l'uso clinico, quali gli score clinici, il tipo di trascritto del gene di fusione BCR-ABL (b2a2 e b3a2), i livelli di espressione delle proteine di trasporto ABCB1 e ABCG2 e l'espressione del gene WT1 su una coorte retrospettiva di 64 pazienti affetti da LMC, seguiti dal 2012 al 2017 presso la Clinica Ematologica di Udine.

I pazienti sono stati studiati al momento dell'esordio, a 3, 6 e 12 mesi dall'inizio della terapia con TKI, analizzando l'RNA purificato da sangue periferico. Tutte le valutazioni della risposta alla terapia sono state eseguite in accordo alle linee guida internazionali Leukemia Net, suddividendo i pazienti in optimal responders, warning e failure, secondo l'entità di calo del trascritto di BCRABL alle 3 tempistiche indicate sopra.

Tra le variabili analizzate, solo l'espressione di WT1 ha mostrato un'associazione significativa sul livello di risposta conseguita. Il trascritto di WT1 è risultato altamente

espresso nella maggior parte dei casi all'esordio e si è associato con una peggior risposta ai TKIs a tutti i Time point rilevanti, cioè a 3, 6 e 12 mesi ($P = 0,004$; $P = 0,0008$; $P = 0,0149$ rispettivamente) sia complessivamente che nei sottogruppi di pazienti sottoposti a TKI di prima o seconda generazione. Inoltre è stato possibile identificare un livello soglia di WT1 all'esordio oltre cui identificare i pazienti con un aumentato rischio di fallimento terapeutico.

In merito alle proteine di resistenza ABCB1 e ABCG2, come atteso, si è osservato un aumento della loro espressione sotto terapia con TKIs in tutte le determinazioni, anche se in particolare è stato osservato un importante incremento dei livelli di ABCG2 al terzo mese di terapia. Inoltre, un valore elevato di ABCG2 all'esordio si è dimostrato associato a una peggior risposta precoce, ma non quella a lungo termine ($P = 0,048$ a 3 mesi e $P = 0,1575$ a 12 mesi). Infine è stata condotta un'analisi dei possibili fattori di rischio per una peggior risposta alla terapia e l'espressione di WT1 all'esordio si è rivelata l'unico fattore significativo rispetto a score clinico ELTS e il tipo di TKI somministrato. Se questo indicatore venisse confermato in casistiche più numerose, potrebbe fornire al clinico un valido strumento per stratificare in maniera più adeguata i pazienti con LMC e garantire il miglior approccio terapeutico, in modo da ridurre i costi di terapie poco mirate e conseguire risposte precoci.

INDICE

| | |
|--|----|
| Capitolo 1 - INTRODUZIONE | 1 |
| 1.1 Leucemia Mieloide Cronica: patogenesi molecolare | 1 |
| 1.1.1 Il cromosoma Philadelphia | 2 |
| 1.1.2 Il gene ABL | 4 |
| 1.1.3 Il gene BCR | 5 |
| 1.1.4 Il gene di fusione BCR-ABL | 6 |
| 1.2 La Leucemia Mieloide Cronica: caratteristiche cliniche | 10 |
| 1.2.1 Diagnosi | 11 |
| 1.3 La Terapia | 12 |
| 1.3.1 Gli inibitori delle tirosin chinasi (TKIs) | 14 |
| 1.3.2 Malattia Minima Residua (MMR) e risposta molecolare profonda | 16 |
| 1.3.3 Resistenza alla terapia | 20 |
| 1.4 Le proteine di trasporto ABC | 22 |
| 1.5 Il gene del tumore di Wilms 1 (WT1) | 25 |
| Capitolo 2 – SCOPO della TESI | 29 |
| Capitolo 3 - MATERIALE e METODI | 31 |
| 3.1 Materiali | 31 |
| 3.1.1 Pazienti oggetto di studio | 31 |
| 3.1.2 Linea cellulare | 31 |

| | |
|---|--------|
| 3.2 Metodi | 32 |
| 3.2.1 Separazione mediante buffy-coat e stoccaggio | 32 |
| 3.2.2 Estrazione RNA e valutazione dell'integrità e della concentrazione | 34 |
| 3.2.3 RT-PCR qualitativa | 35 |
| 3.2.4 Real Time PCR quantitativa | 38 |
| 3.2.4.1 Saggio BCR-ABL | 38 |
| 3.2.4.2 Saggio ABCB1 e ABCG2 | 39 |
| 3.2.4.3 Saggio WT1 | 40 |
| 3.2.5 Analisi statistica | 42 |
| Capitolo 4 - Risultati | 43 |
| 4.1 Caratterizzazione dei pazienti oggetto di studio | 43 |
| 4.2 Analisi del tipo di trascritto BCR-ABL | 46 |
| 4.3 Analisi dell'espressione dei geni ABCB1 e ABCG2 | 47 |
| 4.4 Espressione del gene WT1 | 52 |
| 4.4.1 Espressione dell'RNA del gene WT1 all'esordio | 52 |
| 4.4.2 Espressione dell'RNA del gene WT1 all'esordio in relazione alla risposta ai TKIs | 53 |
| 4.4.3 Espressione dell'RNA del gene WT1 all'esordio in relazione alla risposta a Imatinib | 55 |
| 4.4.4 Espressione dell'RNA del gene WT1 all'esordio in relazione alla risposta ai 2g-TKIs | 58 |
| 4.5 Studio di associazione con la risposta ai TKIs | 60 |
| Capitolo 5 – Discussione e Conclusioni | 62 |
| Bibliografia | 72 |

Capitolo 1 – INTRODUZIONE

1.1 Leucemia Mieloide Cronica: patogenesi molecolare

La Leucemia Mieloide Cronica (LMC) è una malattia mieloproliferativa cronica originante dalla trasformazione neoplastica di una cellula staminale emopoietica (HSC) [Fialkow et al, 1981] ed è caratterizzata dalla presenza di una specifica anomalia citogenetica, il cromosoma Philadelphia (Ph) [Nowell et al, 1960] (Figura 1.1).

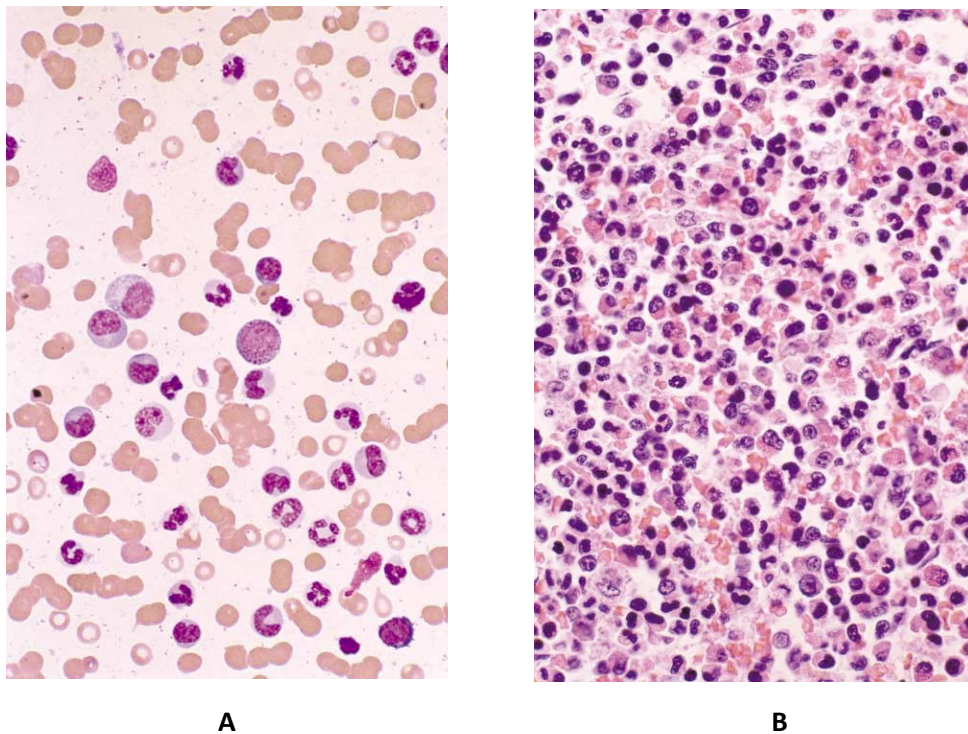


Figura 1.1. Immagine dello striscio di sangue periferico (A) e della biopsia di midollo osseo (B) di un paziente con LMC in fase cronica. Nel sangue periferico è evidente la presenza di un eccesso di granulociti e dei loro precursori e nel midollo osseo la marcata iperplasia mieloide con rappresentazione di tutti gli stadi di maturazione della linea granulocitaria [Sawyers, 1999].

1.1.1 Il cromosoma Philadelphia

Nel 1960, la scoperta del cromosoma Philadelphia (Ph) da parte di Nowell e Hungerford ha fornito un indizio importante sulla causa della leucemia mieloide cronica. Il cromosoma Ph è stata la prima anomalia citogenetica specificatamente associata ad un tipo di neoplasia, ed è ora noto che esso rappresenta l'unica anomalia clonale dimostrabile alla diagnosi in oltre il 95% dei pazienti con LMC [Nowell et al, 1961; Chen et al, 2010].

Con l'avvento di varie tecniche di banding cromosomico, intorno al 1970, fu chiaro che il cromosoma Ph rappresenta un cromosoma 22 derivativo, più corto della sua controparte normale ed originante da una traslocazione reciproca tra le braccia lunghe dei cromosomi 9 e 22, con breakpoints rispettivamente a livello q34 e q11: $t(9;22)(q34;q11)$ [Rowley, 1973] (Figura 1.2).

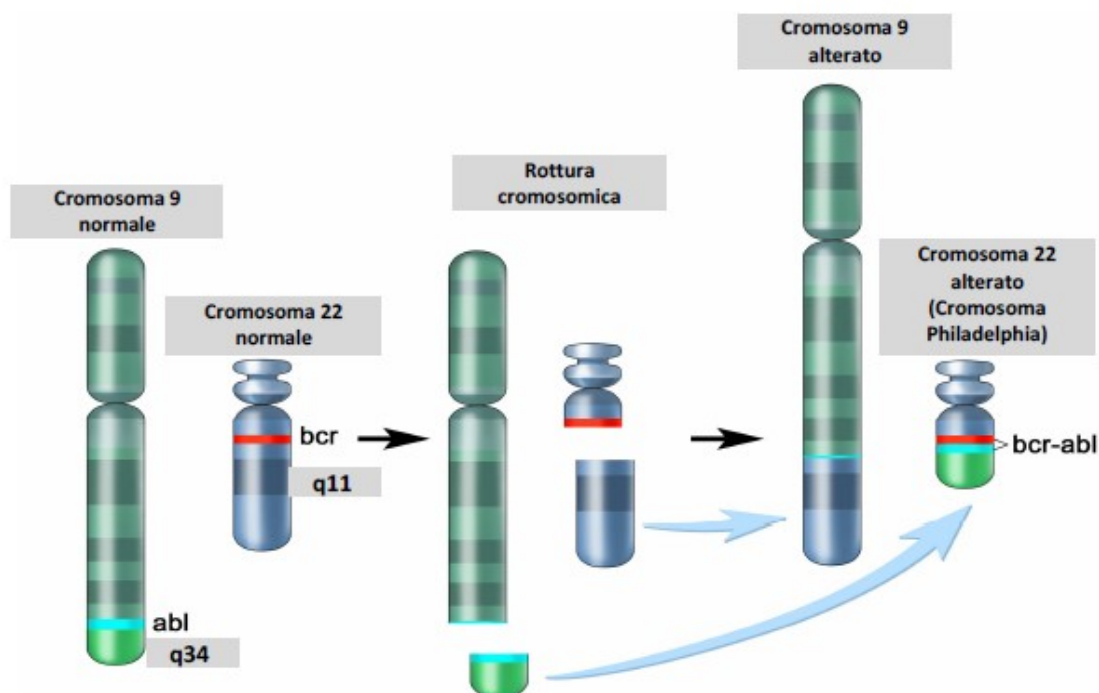


Figura 1.2. Descrizione del meccanismo di rottura cromosomica alla base della formazione del cromosoma Philadelphia [www.meb.uni-bonn.de/Cancernet/Media].

Negli anni successivi, sono state chiarite le basi molecolari della LMC: la conseguenza della traslocazione del gene ABL (Abelson - localizzato sul cromosoma 9) sul cromosoma 22, in corrispondenza del gene BCR (breakpoint cluster region), è la formazione del gene ibrido di fusione BCR-ABL [Chen et al., 2010; Deininger et al., 2000].

Il gene ABL, nella sua forma “wild type”, codifica una proteina con attività tirosino chinasi, localizzata prevalentemente nel nucleo, mentre BCR codifica per una proteina citoplasmatica costituzionalmente espressa. Il risultato del gene di fusione BCR-ABL è la sintesi di una tirosinchinasi citoplasmatica costitutivamente attiva che non causa un blocco del differenziamento cellulare, ma induce la proliferazione ed inibisce l’apoptosi degli elementi della linea mieloide. La presenza del cromosoma Ph (e quindi del suo prodotto, il gene ibrido BCR-ABL) è condizione necessaria e sufficiente alla trasformazione neoplastica che porta allo sviluppo della LMC; nei rari casi (meno del 5%) in cui il cromosoma Ph non è riscontrabile all’analisi citogenetica convenzionale, è sempre documentabile il riarrangiamento BCR-ABL, con tecniche di citogenetica molecolare (FISH) e/o di biologia molecolare [Savage et al, 2002; Sverre & Mitelman 2009].

Non è del tutto chiarito quali siano i meccanismi in grado di favorire la traslocazione; una tra le ipotesi proposte prevede la presenza di siti di fragilità in corrispondenza dei punti di rottura sul DNA. Secondo un’altra ipotesi, invece, sarebbe la distribuzione spaziale dei cromosomi 9 e 22 prima dell’allineamento in metafase che, comportando la vicinanza dei geni ABL e BCR, potrebbe favorire una ricombinazione illegittima.

L'analisi delle sequenze fiancheggianti i punti di rottura non ha, tuttavia, rilevato la presenza di sequenze ripetute potenzialmente favorevoli le traslocazioni [Melo et al, 2004].

1.1.2 Il gene ABL

Il gene ABL (Abelson), più estesamente studiato, è l'omologo umano dell'oncogene virale v-abl (Abelson murine leukemia virus), ha 11 esoni ed è lungo più di 230 kilobasi (Kb). La sua trascrizione, attraverso splicing alternativo, produce un mRNA che codifica per una proteina tirosinchinasica non recettoriale (enzima che promuove il trasferimento di un gruppo fosfato dell'ATP ad una tirosina del substrato) di 145 KDa indispensabile per la regolazione della progressione nel ciclo cellulare e per la traduzione di alcuni segnali, mediati dalle integrine, provenienti dall'ambiente extracellulare. Il gene ABL è espresso a bassi livelli in tutte le cellule dei tessuti normali dell'organismo.

Tramite legame con la p53, la p145^{ABL}, che ha localizzazione prevalentemente nucleare, induce un blocco proliferativo in fase G1/S necessario per consentire la riparazione di eventuali danni del DNA o l'innescio dell'apoptosi. Oltre a regolare il ciclo cellulare, la proteina Abl svolge un ruolo nella risposta agli stress genotossici e nella trasmissione, attraverso segnali di adesione, di informazioni riguardanti l'ambiente cellulare.

Nella p145^{ABL}, oltre al dominio funzionale ad attività tirosinchinasica (SH1), esistono alcuni siti funzionali ad attività regolatoria (SH2 ed SH3, rispettivamente potenziante ed inibente l'attività tirosinchinasica) ed una regione C-terminale capace di interagire

con sequenze di DNA e di legare l'actina e altre proteine cellulari. L'actina è importante per il controllo dell'organizzazione del citoscheletro, dell'aderenza cellulare e per la trasduzione dei segnali mediata dalle integrine [Melo et al, 2004; Shet et al, 2002].

1.1.3 Il gene BCR

Meno nota è la funzione della proteina di 160 KDa, codificata dal gene BCR, che è espressa ubiquitariamente, ma in particolare nelle cellule ematopoietiche. Il gene BCR si estende su di un segmento di DNA di 130 kilobasi (Kb) ed è costituito da 23 esoni. Questa proteina che si localizza esclusivamente a livello citoplasmatico, può modificare la propria conformazione sterica tramite legame con GTP/GDP ed è in grado di formare omotetrameri in vitro. Essa presenta all'estremo N-terminale un dominio di oligomerizzazione, capace di legare sequenze omologhe, ed un dominio dotato di attività serina/treoninachinasica (nell'esone 1) con funzione fisiologica non nota ma che potrebbe portare alla fosforilazione di vari substrati tra cui lo stesso bcr. Nell'esone 1 sono presenti anche i siti che legano i domini SH2: ad esempio GRb-2 (coinvolto nell'attivazione di Ras) si associa con il sito che contiene una fosfotirosina in posizione 177.

Il centro della molecola contiene un dominio GEF (Guanine Exchange Factor) che promuove lo scambio di GTP con GDP in proteine che attivano fattori di trascrizione. Nella porzione C-terminale c'è un dominio GAP (Guanosine triphosphatease-Activating Protein) che agisce su RAC, una GTPasi della superfamiglia RAS [Deininger et al, 2000; Melo et al, 2004].

1.1.4 Il gene di fusione BCR-ABL

Il punto di rottura sul cromosoma 9 è stato localizzato, nella maggior parte dei pazienti, in una sequenza intronica di 300 Kb tra gli esoni 1a, 1b e 2, mentre sul cromosoma 22 all'interno del gene BCR i breakpoints possono interessare più regioni, con conseguente formazione di almeno tre distinti geni di fusione codificanti per proteine a diverso peso molecolare (Figura 1.3):

- p190: punto di rottura sul cromosoma 22 fra gli esoni e1-e2 (Minor Breakpoint Cluster region, m-bcr);
- p210: punto di rottura tra gli esoni b1-b5 (Major Breakpoint Cluster region, M-bcr, circa 5,8 Kb);
- p230: con punto di rottura tra gli esoni e19-e20 (μ -bcr, zona di rottura centromerica rispetto a M-bcr).

È stato dimostrato che l'aumento della lunghezza della porzione di BCR nella proteina di fusione è correlata a una diminuzione dell'attività tirosinchinasica di ABL: di conseguenza la p230 mostra un'attività tirosinchinasica più bassa rispetto a p210 e p190, e a sua volta p210 ha attività inferiore a p190 [Advani et al, 2002].

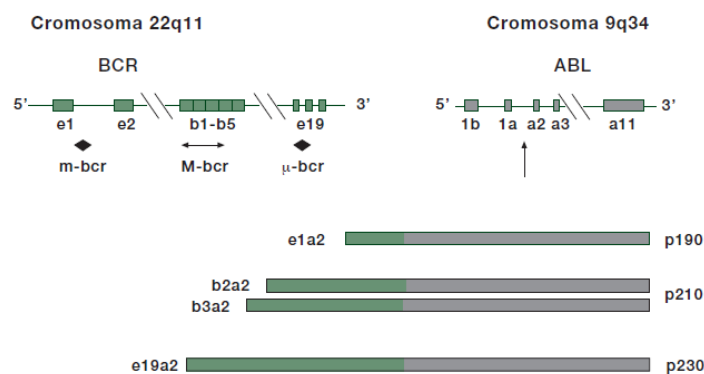


Figura 1.3. Rappresentazione schematica del gene di fusione BCR/ABL e le sue isoforme [Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia Università "La Sapienza" Roma].

La quasi totalità dei pazienti con LMC esprime la $p210^{BCR/ABL}$, a differenza di $p190$ e $p230$ che sono rare nella LMC tipica, mentre sono caratteristiche rispettivamente della leucemia acuta linfoblastica (LAL) Ph^+ . La proteina ibrida di 210 Kb è diversa dal prodotto del gene ABL wild type, perché contiene all'estremità N-terminale delle sequenze di BCR essenziali per l'attività costitutiva dell'attività tirosina-chinasica e per il potenziale leucemogenico dell'oncogene chimerico BCR-ABL.

La formazione della proteina ibrida $p210^{BCR/ABL}$ porta, quindi, ad una alterazione strutturale di alcuni siti regolatori delle proteine abl e bcr; quest'ultima nel prodotto chimerico della traslocazione 9;22 agisce promuovendo la dimerizzazione dell'oncoproteina, in modo tale che due molecole bcr-abl adiacenti si fosforilino reciprocamente (autofosforilazione) sui residui tirosinici dei propri domini di attivazione chinasica con piena attivazione della chinasi aberrante [Cortes et al, 1996; Quintás-Cardama et al, 2009].

Altri domini di BCR-ABL sono coinvolti nella sua attività leucemogenica: sempre nella porzione bcr l'oncoproteina contiene oltre al dominio di dimerizzazione, una regione di legame a domini SH2 con residui di serina e treonina fosforilati e più all'estremità N-terminale l'importante residuo di tirosina 177, mediante il quale bcr-abl lega il dominio SH2 di una proteina adattatrice (GRb-2 – growth factor receptor-bound protein 2) che connette $p210^{BCR/ABL}$ a diverse vie di trasduzione del segnale (RAS, STAT, JAK-1, JUN, MYC e PIP3-kinasi) che rendono la cellula Ph^+ indipendente dai fattori di crescita causando l'inibizione della morte cellulare programmata (apoptosi) e l'attivazione di segnali mitogenici.

L'oncoproteina, inoltre, mantiene la "normale" capacità di Abl di legare l'actina ma, nel legarla, determina la fosforilazione di una serie di proteine del citoscheletro che contribuiscono all'aberrante funzione adesiva delle cellule leucemiche; la capacità di adesione, sia allo stroma che alla matrice extracellulare viene modificata, comportando così il prematuro rilascio di progenitori e precursori nel sangue periferico e la perdita del controllo proliferativo. Oltre a ciò, le cellule Ph⁺ presentano una disregolazione della trasduzione del segnale mediata dal sistema integrinico.

Anche l'abnorme localizzazione di p210^{BCR/ABL} (Abl è normalmente presente soprattutto a livello nucleare) nel citoplasma assume grande importanza nella fisiologia della LMC, poiché è stato dimostrato che se bcr-abl viene forzata a localizzarsi all'interno del nucleo può attivamente indurre apoptosi invece che promuovere segnali antiapoptotici.

Riassumendo, il risultato finale derivante dal gene di fusione BCR-ABL è una proteina chimerica che comporta una proliferazione cellulare incontrollata, una diminuita aderenza delle cellule leucemiche allo stroma del midollo osseo ed una ridotta risposta apoptotica a stimoli mutageni, oltre che un'alterata degradazione di importanti proteine cellulari [Goldman et al, 2003; Melo et al, 2003] (Figura 1.4).

Le caratteristiche ematologiche della fase cronica della LMC, cioè l'espansione ed il prematuro ricircolo della popolazione maligna mieloide, si possono perciò spiegare sulla base dell'attivazione, promossa da bcr-abl, di vie di trasduzione del segnale che mediano effetti mutageni, antiapoptotici e di abnorme funzione del citoscheletro. In questo contesto appare evidente che p210^{BCR/ABL} attiva le stesse vie di trasduzione dei segnali intracellulari attivate dalle citochine che controllano la crescita e la

differentiazione delle cellule ematopoietiche normali, ma, essendo il segnale di BCR-ABL costitutivo, le cellule Ph⁺ eludono i segnali regolatori fisiologici. Esistono evidenze, infatti, che il vantaggio proliferativo che BCR-ABL conferisce ai progenitori leucemici rispetto ai normali elementi ematopoietici, sia in parte dovuto all'espressione costitutiva di fattori che stimolano la crescita.

L'aumentata mutagenicità (le alterazioni più frequenti sono la trisomia del cromosoma 8 o 19, l'isocromosoma 17, la duplicazione del cromosoma Ph e le mutazioni inattivanti i geni codificanti per le proteine ad attività onco-soppressiva come p53, p16, pRb) e la diminuita suscettibilità all'apoptosi, possono essere responsabili della progressione della malattia. Inoltre, la popolazione leucemica in continua proliferazione è soggetta maggiormente all'insorgenza di aberrazioni genetiche secondarie (instabilità genetica), che possono essere tollerate meglio solo grazie al fenotipo antiapoptotico conferito dalla presenza di p210^{BCR/ABL}. In questo modo viene favorita la comparsa di cloni maligni multipli con nuovi errori genetici che determinano la progressione della malattia e la crisi blastica.

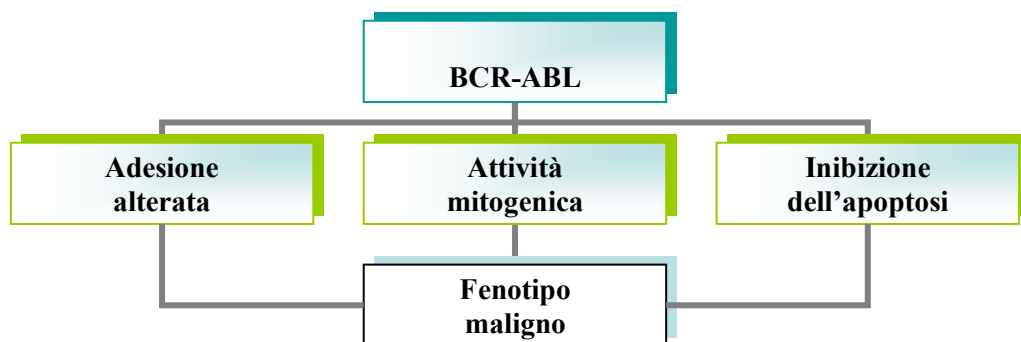


Figura 1.4. Meccanismi implicati nella patogenesi della leucemia mieloide cronica [Deininger et al., 2000].

1.2 Leucemia Mieloide Cronica: caratteristiche cliniche

L'incidenza della LMC è pari a 1-2 casi su 100.000 nel mondo, rappresentando ogni anno circa il 15% dei nuovi casi di leucemia fra gli adulti [Jabbour et al., 2012]. Colpisce prevalentemente i soggetti di sesso maschile e insorge mediamente attorno ai 45-55 anni [Frazer et al., 2007]. Sebbene non sia noto il meccanismo responsabile della trasformazione neoplastica della cellula staminale emopoietica, numerosi studi hanno dimostrato che l'esposizione a radiazioni ionizzanti induce un aumento dell'incidenza di LMC rispetto alla frequenza attesa nella popolazione generale [Cortes et al., 1996; Radich, 2010; Goldman, 2010].

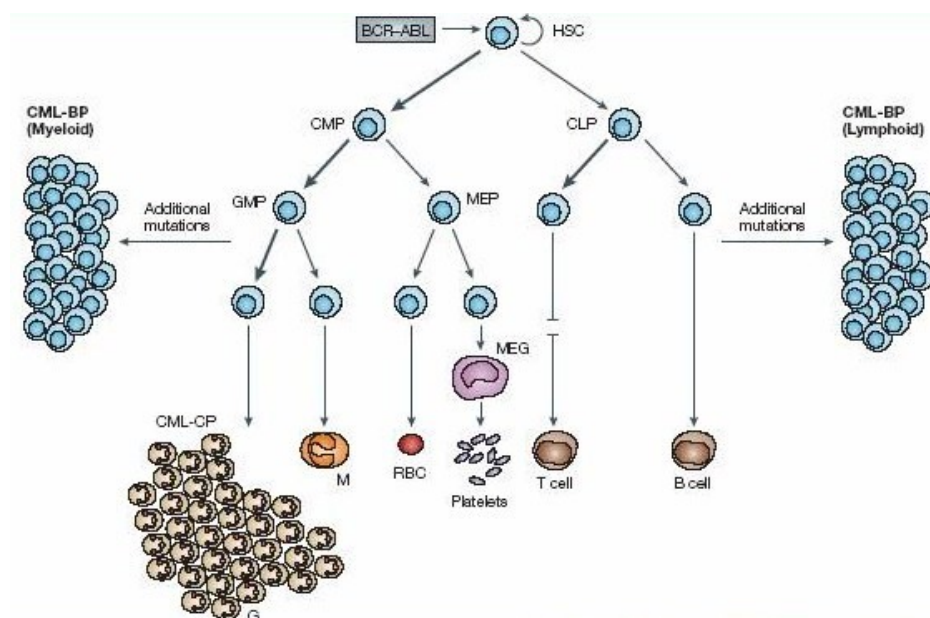


Figura 1.5. Lo sviluppo della leucemia mieloide cronica [Ren, 2005].

La LMC ha un decorso caratteristicamente trifasico, contrassegnato cioè da una fase iniziale (definita fase cronica) con espansione del comparto mieloide ma mantenimento della capacità differenziativa, da una fase intermedia (fase accelerata) in cui aumenta l'attività proliferativa a discapito di quella maturativa, ed una fase

terminale (crisi blastica) in cui la malattia ha caratteristiche cliniche e laboratoristiche tipiche di una leucemia acuta [Faderl et al., 1999; Castoldi & Liso, 2004; Cortes et al. 2004]. L'alterazione cromosomica causante la LMC, il cromosoma Ph, compare a livello delle cellule staminali pluripotenti, e coinvolge pertanto tutte le linee ematopoietiche (eritrocitaria, piastrinica, granulocitaria, monocitaria e linfocitaria B) [Sverre & Mitelman, 2009; Perrotti et al., 2010]. La fase cronica della LMC, che se non trattata dura mediamente 4-5 anni, è caratterizzata da una massiccia espansione della serie granulocitaria. L'acquisizione di ulteriori mutazioni genetiche, legate all'instabilità genomica indotta da BCR-ABL, causa la progressione della LMC dalla fase cronica alle fasi avanzate della malattia, caratterizzate da un accumulo di blasti mieloidi (in circa due terzi dei casi) o blasti linfoidi (in un terzo dei casi) [Ren, 2005; Sawyers, 1999; von Bubnoff et al., 2010; Cortes, 2004] (Figura 1.5).

1.2.1 Diagnosi

Nella maggior parte dei casi, la diagnosi di LMC è casuale; in soggetti asintomatici si riscontra una leucocitosi di grado variabile con precursori mieloidi circolanti, mentre il numero di piastrine può essere normale, aumentato o ridotto; l'emoglobina tende ad essere normale o, più frequentemente, ridotta. Dal punto di vista clinico è spesso presente splenomegalia. L'esame di uno striscio di sangue periferico presenta un eccesso di granulociti e dei loro precursori, mentre l'agoaspirato midollare rivela una marcata iperplasia mieloide con rappresentazione di tutti gli stadi di maturazione della linea granulocotaria [Sessions, 2007; Hehlmann et al, 2007; Castoldi & Liso, 2004].

La conferma della diagnosi di LMC si basa sull'identificazione del cromosoma Philadelphia o del suo prodotto, il gene ibrido BCR-ABL. Ciò può essere ottenuto mediante tecniche di citogenetica classica o molecolare (fluorescence in situ hybridization-FISH) oppure mediante tecniche molecolari di reazione a catena della polimerasi che amplifica il DNA retrotrascritto (RT-PCR). Le tecniche molecolari citate hanno, naturalmente, maggiore sensibilità rispetto alle tecniche di citogenetica classica, che però permettono di valutare la presenza di aberrazioni cromosomiche aggiuntive al cromosoma Ph [Hehlmann et al, 2007; Sverre & Mitelman, 2009; Barch et al, 1997].

1.3 La Terapia

Inizialmente lo scopo della terapia della LMC si basava principalmente sul contenimento della massa leucemica. Questo obiettivo venne perseguito a partire dagli anni '50 del XX secolo attraverso l'uso di agenti chemioterapici convenzionali, quali busulfano e idrossiurea. L'idrossiurea è un agente antiproliferativo che riduce rapidamente la massa cellulare e induceva una buona remissione clinica ed ematologica nei pazienti, ma raramente una risposta citogenetica. Questo tipo di terapia migliorava la qualità della vita del paziente contenendo la massa tumorale ma non portava alla remissione completa della malattia e all'eradicazione delle cellule Ph+. La leucemia, pertanto, manteneva inalterato il suo percorso dalla fase cronica a quella blastica [Talpaz et al, 2002; Druker et al, 2001].

La consapevolezza di questi limiti portò, dalla fine degli anni '70, all'utilizzo del trapianto di cellule staminali allogeniche, considerato l'unico trattamento in grado di

eradicare definitivamente la malattia, soprattutto se effettuato durante la fase cronica. Tuttavia il trapianto è una procedura gravata da una elevata incidenza di mortalità e morbidità, è praticabile soltanto in pazienti relativamente giovani e senza patologie concomitanti di rilievo e, soprattutto, necessita della disponibilità di un donatore compatibile. Per tali motivi, il trapianto allogenico risulta praticabile soltanto in una minoranza dei pazienti con LMC [Gratwohl et al, 1998; Passweg et al, 2004; Crawley et al, 2005; Frazer et al, 2007].

Con la comprensione dei meccanismi molecolari che sottendono alla trasformazione neoplastica, lo scopo della terapia si è spostato dal semplice contenimento alla soppressione del clone cellulare Ph+, al fine di ritardare il più possibile la progressione della malattia in fase avanzata. L'approccio terapeutico non trapiantologico ha previsto, dagli anni '80, l'uso dell'interferone- α (INF α). Gli studi clinici dimostrarono che l'impiego di INF α , il cui meccanismo d'azione non è ancora del tutto noto ma probabilmente interferisce in maniera specifica con la traduzione dei segnali proliferativi nelle cellule Ph+, poteva protrarre la fase cronica della malattia e migliorare la sopravvivenza, soprattutto in quella frazione di pazienti (15-20%) che otteneva una risposta citogenetica completa (ovvero la scomparsa del cromosoma Ph). Questo trattamento, però, comportava pesanti effetti collaterali, specialmente nelle persone più anziane rendendo necessario sospendere la terapia [Guilhot et al, 1997; Baccarani et al, 2002].

1.3.1 Gli inibitori delle tirosin chinasi (TKIs)

La terapia per i pazienti affetti da LMC è cambiata completamente con l'introduzione degli inibitori delle tirosin-chinasi (Tyrosine-Kinase Inhibitors – TKIs) che agiscono sull'attività tirosina-chinasica di p210^{BCR/ABL}, occupando in modo competitivo il sito di legame per l'ATP, necessario per la fosforilazione del substrato e quindi inibendo il funzionamento di questa proteina. In questo modo è possibile bloccare la trasduzione del segnale e la cascata che ne deriva portando ad apoptosi la cellula, riducendo in modo significativo l'eccessiva proliferazione cellulare. Questi farmaci sono in grado di normalizzare le manifestazioni cliniche della malattia in un numero molto maggiore di pazienti e con minore tossicità. Il meccanismo di azione prevede tre effetti: inibizione dell'autofosforilazione di BCR-ABL e di fosforilazione del substrato (già nei primi minuti di trattamento), inibizione della proliferazione ed infine induzione all'apoptosi (nelle seguenti 16-20 ore) [Iacobucci, et al., 2006].

Attualmente in commercio sono presenti 5 tipi di TKIs, quali l'Imatinib, il Dasatinib, il Nilotinib, il Bosutinib e il Ponatinib.

Tra essi, l'Imatinib mesilato (Glivec, Novartis Pharmaceutical Corporation) è stato il primo farmaco inibitore delle tirosin-chinasi ed ha totalmente rivoluzionato l'approccio terapeutico a questo tipo di malattia ed attualmente, in seguito dello studio IRIS (*International Randomized Study of Interferon and STI571*) che ha dimostrato come l'assunzione di Imatinib è in grado di aumentare notevolmente il tasso di sopravvivenza libera da malattia [Jabbour & Kantarjian, 2016], rappresenta la terapia di prima scelta nella fase cronica della LMC. La sua notevole efficacia terapeutica e la possibilità di ottenere anche remissioni molecolari suggerisce che il passaggio alla crisi

blastica può essere posposto di molti anni nella maggior parte dei pazienti con LMC [Druker et al, 2001; Savage et al, 2002; Kantarjian et al, 2002; Hughes et al, 2003; De Lavallade et al, 2008].

Nonostante gli ottimi risultati ottenuti dalla somministrazione di questo farmaco sono stati riscontrati dei meccanismi di resistenza a imatinib, probabilmente dovuti a mutazioni puntiformi. Ciò ha portato alla progettazione di inibitori di seconda generazione quali: il Dasatinib, il Nilotinib e il Bosutinib. Queste nuove molecole di sintesi, ottimizzate per l'azione sulla molecola di fusione BCR-ABL in modo molto più specifico rispetto all'Imatinib, inoltre, sembrano capaci di ottenere risposte molecolari complete in un tempo molto più breve [Frazer et al, 2007; Mauro, 2009; Hochhaus et al., 2008; Hochhaus et al., 2009; Baccarani et al., 2009].

Il Dasatinib (Sprycel, Bristol-Myers Squibb) è un TKI di seconda generazione 300 volte più potente e selettivo dell'Imatinib in vitro. È in grado di agire su BCR-ABL mutato Imatinib-resistenti tranne nel caso delle mutazioni T315I e F317V/L.

Il Nilotinib (Tasigna, Novartis Pharmaceutical Corporation) è un analogo strutturale dell'Imatinib, con un'affinità per la tasca di legame con l'ATP 30 volte maggiore rispetto a quest'ultimo. Anche il Nilotinib, come il Dasatinib, presenta la capacità di ottenere una risposta ematologica e citogenetica in tempi significativamente più rapidi e anche in soggetti con resistenza all'Imatinib, risultando efficace nel caso di presenza delle mutazioni più comuni.

Il Bosutinib (Bosulif, Pfizer Inc) è anch'esso un inibitore di seconda generazione, in grado di funzionare in presenza delle più frequenti mutazioni di BCR-ABL causative di

resistenza tranne nel caso della mutazione T315I e V299L. È molto più potente dell'Imatinib.

Il Ponatinib (Iclusig, Ariad Pharmaceuticals) è un inibitore di terza generazione ad azione multitarget. Può inibire la maggior parte delle proteine BCR-ABL resistenti per mutazioni. Specialmente nel caso della mutazione T315I il Ponatinib presenta una particolare struttura contenente un legame triplo tra due carboni capace di eludere l'ingombro sterico dovuto alla presenza dell'isoleucina.

1.3.2 Malattia minima residua e risposta molecolare profonda

La malattia minima residua (MMR) viene definita come la quota residua di cellule neoplastiche non eradicate dalla terapia; tali elementi tumorali possono espandersi nuovamente dando origine alla recidiva clinica.

L'individuazione della quota di malattia residua rappresenta un indicatore sensibile dell'efficacia del trattamento e una sua stima accurata è una tappa importante per una migliore gestione terapeutica della neoplasia. Inoltre, la possibilità di monitorare i pazienti con MMR nel corso del tempo, può fornire un'ulteriore opportunità per un precoce riconoscimento della progressione o della ricaduta di malattia nonché di determinare la risposta del paziente al trattamento o di eventuali resistenze ai farmaci dovute principalmente ad alterazioni molecolari (mutazioni puntiformi, meccanismi di espulsione dei farmaci dall'interno della cellula ecc.), con conseguente ottimizzazione della terapia [Hochhaus et al., 2000; Cortes et al, 2011; Radich, 2009].

Le metodiche di studio della MMR devono essere pertanto sensibili, specifiche, riproducibili, quantitative e di pratica applicabilità. Per questo motivo è stato dedicato

un notevole impegno allo sviluppo di tecniche capaci di individuare un numero sempre più piccolo di cellule neoplastiche residue [Beillard et al, 2003; Gabert et al, 2003].

Il grado di riduzione del carico tumorale dopo terapia, è un importante fattore prognostico per i pazienti con LMC, e può essere espresso a tre livelli (Tabella 1.2):

- risposta ematologica, definita come la normalizzazione dei valori di leucociti, piastrine ed emoglobina e scomparsa dei precursori circolanti;
- risposta citogenetica, definita come la percentuale di cellule Ph+;
- risposta molecolare, definita come la proporzione del residuo del gene BCR-ABL, del suo trascritto (mRNA) o della proteina di fusione bcr-abl.

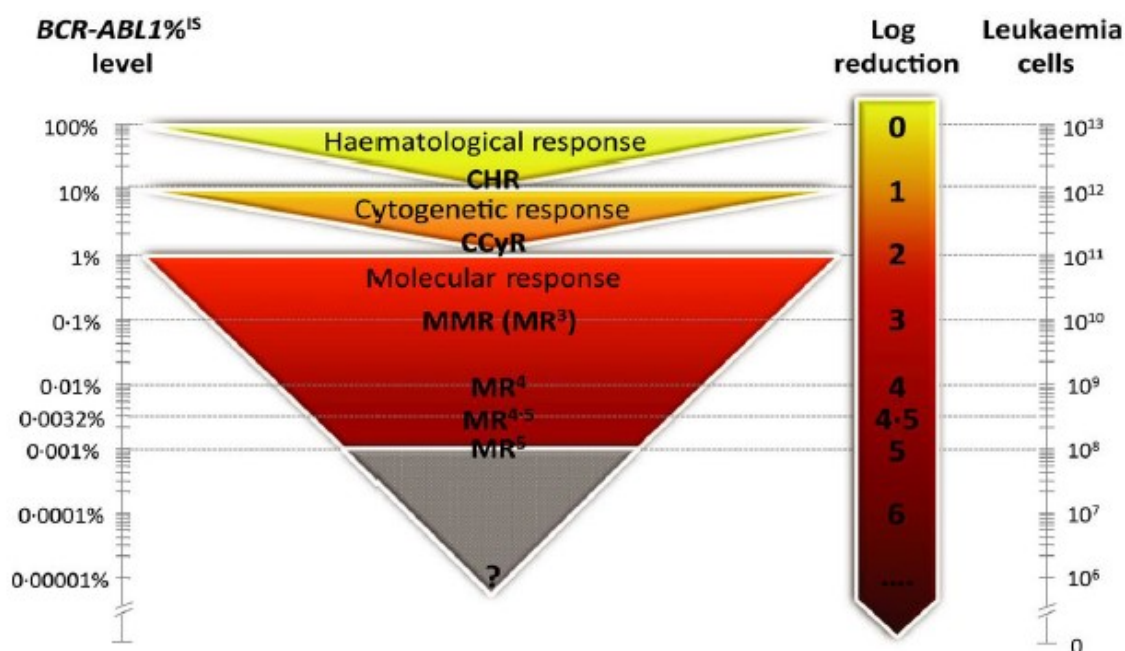


Figura 1.6. Relazione approssimativa tra la risposta, il numero presunto di cellule leucemiche, il livello di trascritti di BCR-ABL e i livelli di risposta molecolare (MR) espressi in scala internazionale (IS) e definiti sulla base della riduzione logaritmica rispetto al valore baseline. Quando è stata raggiunta una completa risposta citogenetica, il (presunto) numero di cellule Ph residuo può essere misurato solo con metodi molecolari quantitativi. Il dato evidenzia l'importanza dei metodi molecolari nella valutazione della risposta al trattamento. In relazione alla profondità di MR, i pazienti possono essere stratificati in coloro che hanno una MR4, MR4.5 o MR5, sulla base del numero di copie del gene di controllo che deve essere all'interno di intervalli definiti, per assicurare un'adeguata sensibilità. Al di sotto della MR5, che costituisce il livello più profondo di MR, la malattia residua non può essere rilevata e quantificata, anche se le cellule leucemiche possono essere ancora presenti [Baccarani et al., 2006; Cross et al., 2015].

Per un corretto management clinico dei pazienti con LMC, nell'era degli inibitori delle tirosin-chinasi (TKI), il monitoraggio molecolare della malattia minima residua del trascritto BCR-ABL riveste un ruolo di fondamentale importanza, in quanto la maggior parte dei pazienti ottengono una risposta citogenetica completa e richiedono pertanto un monitoraggio molecolare in grado di determinare in modo più sensibile la malattia minima residua [Cortes et al, 2011; Radich, 2010; Kantarjian et al, 2008]. Allo stato attuale dell'arte tale indagine viene eseguita mediante Real-Time PCR (RQ-PCR) ed i risultati finali sono espressi come % BCR-ABL/ABL in International Scale (IS) [Mahon et al., 2014]. Questo metodo molecolare, oltre alla loro grande sensibilità, può essere eseguito su campioni di sangue periferico, è quindi meno invasivo e permette di monitorare il quantitativo di malattia residua anche al di sotto delle quote rivelate dalla citogenetica convenzionale [Hochhaus et al, 2000; Iacobucci et al, 2006; Baccarani et al, 2008].

La risposta molecolare nella LMC è definita come la riduzione logaritmica del livello del trascritto di BCR-ABL rispetto al valore della diagnosi, valore convenzionalmente stabilito come il 100% durante lo studio IRIS (IRIS baseline). In relazione alle ottime risposte cliniche durante il trattamento con gli inibitori di 1°, 2° e oggi anche di 3° generazione, possiamo ottenere diversi livelli di risposta molecolare, con un distinguo tra quello che è l'obiettivo molecolare "principe" che è il raggiungimento della MMR (oggi definita come MR3) e quella che per il momento definiamo come risposta molecolare profonda o Deep Molecular Response [Soverini et al., 2016]. La risposta molecolare profonda corrisponde ad una riduzione del livello di malattia di almeno 4

logaritmi rispetto al valore dello standard teorico internazionale alla diagnosi, valore posto pari al 100% dallo studio IRIS, e precisamente:

- MR4: livello del trascritto BCR-ABL^{IS} non detectabile o $\leq 0.01\%$ con un numero di copie di ABL compreso tra 20000 e 31999;
- MR4.5: livello del trascritto BCR-ABL^{IS} non detectabile o $\leq 0.0032\%$ con un numero di copie di ABL compreso tra 32000 e 99.999;
- MR5: livello del trascritto BCR-ABL^{IS} non detectabile o $\leq 0.001\%$ con almeno 100000 copie di ABL.

Ad oggi, la risposta ai TKIs è il fattore prognostico più importante e in questo contesto le raccomandazioni Europee LeukemiaNet, non raccomandano quale TKI dovrebbe essere usato, ma quale risposta dovrebbe essere raggiunta, indipendentemente dal TKI che viene usato.

Le risposte sono definite come:

- "*Optimal*" = è associata al miglior risultato a lungo termine, cioè con una durata della vita paragonabile a quella della popolazione generale, indicando che non vi è alcuna indicazione per un cambiamento in quel trattamento;
- "*Failure*" = significa che il paziente deve ricevere un trattamento diverso per limitare il rischio di progressione e morte;
- "*Warning*" = zona intermedia, che implica che le caratteristiche della malattia e la risposta al trattamento richiedono un monitoraggio più frequente per consentire cambiamenti tempestivi della terapia in caso di fallimento del trattamento.

Come mostra la tabella 1.1 le risposte ai TKIs sono definite in base al livello di trascritto di BCR-ABL ai *time-point* di controllo del paziente.

| <i>Tempo</i> | <i>Optimal</i> | <i>Warning</i> | <i>Failure</i> |
|----------------|----------------------|---------------------|------------------|
| <i>3 mesi</i> | BCR-ABL $\leq 10\%$ | BCR-ABL $> 10\%$ | |
| <i>6 mesi</i> | BCR-ABL $< 1\%$ | BCR-ABL 1-10% | BCR-ABL $> 10\%$ |
| <i>12 mesi</i> | BCR-ABL $\leq 0,1\%$ | BCR-ABL $> 0,1-1\%$ | BCR-ABL $> 1\%$ |

Tabella 1.1. Definizione della risposta ai TKIs al trattamento di prima linea [Baccarani et al., 2013].

1.3.3 Resistenza alla terapia

Nonostante gli eccellenti risultati ottenuti dagli inibitori delle tirosin chinasi, una piccola quota di pazienti affetti da LMC manifesta rapidamente, o sviluppa nel tempo, resistenza al farmaco. La mancata risposta alla terapia può essere suddivisa in due categorie, a seconda della sua comparsa:

- Resistenza primaria (molto rara), solitamente riscontrata nel corso dei primi mesi di trattamento nei pazienti che non traggono mai beneficio dall'assunzione degli inibitori;
- Resistenza secondaria, che si manifesta nei pazienti che perdono risposte ematologiche e/o citogenetiche precedentemente raggiunte in corso di terapia con inibitori.

La resistenza agli inibitori delle tirosin-chinasi, sia primaria che secondaria, può riconoscere diversi meccanismi e viene genericamente distinta in resistenza BCRABL-dipendente e BCR-ABL-indipendente.

Nel caso della resistenza BCRABL-dipendente, la mancata efficacia del farmaco è dovuta all'impropria riattivazione dell'attività catalitica dell'oncoproteina BCR-ABL.

Questo fenomeno è solitamente imputabile alla presenza di mutazioni puntiformi a carico della tasca di legame all'ATP e del loop di attivazione della proteina p210^{BCR/ABL} che interferiscono con la capacità del farmaco di inibire l'attività catalitica.

Alternativamente, fenomeni di amplificazione (aumento del numero di copie) del gene codificante per BCR-ABL o di duplicazione del cromosoma Philadelphia possono causare resistenza, in quanto incrementano l'espressione di BCR-ABL all'interno di ciascuna cellula leucemica. In queste condizioni, l'inibitore penetra ugualmente all'interno delle cellule di LMC, ma la sua concentrazione intracellulare non riesce a inibire l'attività catalitica di tutte le molecole di BCR-ABL [Gorre et al, 2001].

La resistenza BCR-ABL-indipendente è invece dovuta all'accumulo di ulteriori alterazioni genetiche che rendono la cellula leucemica capace di proliferare e sopravvivere anche dopo l'inattivazione dell'attività tirosin-chinasica di BCR-ABL o ad un ridotto trasporto delle terapie alle cellule tumorali [Hochhaus, 2006; Bosi, et al., 2012].

In particolare i meccanismi molecolari di resistenza BCR-ABL-indipendente più comuni sono:

- 1) La presenza di proteine nel siero che si legano ai TKIs e ne diminuiscono la quantità disponibile.
- 2) Alti livelli di espressione di MDR (multidrug resistance), può essere mediata dall'attivazione di meccanismi di detossificazione e di riparo del DNA, dal blocco delle vie apoptotiche (solitamente dovuto alla comparsa di mutazioni aggiuntive), dalla riduzione del funzionamento delle pompe di afflusso con conseguente riduzione della concentrazione di farmaco all'interno della cellula.

Infine, la resistenza multifarmaco può dipendere dall'aumentata espressione di pompe di efflusso ATP-dipendenti che causano l'estrusione del farmaco attraverso la membrana plasmatica alterando quindi l'assorbimento del farmaco all'interno della cellula [Mahon et al, 2000; Gottesman, et al., 2002].

- 3) Il ridotto trasporto può dipendere da una riduzione dell'assorbimento dei farmaci a somministrazione orale, da un aumento del metabolismo del farmaco o da un'aumentata clearance, che risultano in ridotti livelli di farmaco nel sangue e una sua diffusione ridotta all'interno della massa tumorale.
- 4) Attivazione di altre vie di trasmissione del segnale intracellulare associate all'evoluzione clonale.

1.4 Le proteine di trasporto ABC

Le proteine di trasporto ATP-Binding Cassette (ABC) sono una grande famiglia di proteine integrali di membrana che, utilizzando l'energia ottenuta dall'idrolisi di ATP attraverso il trasporto attivo primario, permettono il passaggio attraverso le membrane cellulari di una grande varietà di substrati tra cui: ioni organici, amminoacidi, peptidi, proteine, steroli, lipidi, zuccheri, farmaci e metaboliti [Dean et al., 2001].

Molte proteine ABC sono deputate all'estrusione dalle cellule di farmaci xenobiotici e metaboliti potenzialmente citotossici. Questo meccanismo risulta amplificato in pazienti sottoposti a trattamento chemioterapico antineoplastico, poiché le cellule tumorali sono in grado di iperesprimere questi trasportatori ed incrementare l'eliminazione del farmaco, inducendo resistenza. Inoltre, mutazioni identificate su

questi geni ABC codificanti le diverse proteine sono associate a patologia.

L'architettura molecolare è comune per la maggior parte dei membri appartenenti a questa famiglia ed è costituito da:

- Due siti di legame per l'ATP citosolici (NBD – Nucleotide Binding Domain);
- Due domini transmembrana (TMD – Transmembrane Domain).

I due domini citosolici sono altamente conservati e, attraverso l'idrolisi dell'ATP, forniscono l'energia necessaria per il trasporto dei substrati attraverso la membrana. Mentre i due domini transmembrana sono i responsabili della specificità del substrato e variano a seconda del tipo di trasportatore ABC [Jones & George, 2004; Tarling et al., 2013].

La proteina ABCB1, chiamata anche MDR1 (Multi Drug Resistance 1) o Pgp (Glicoproteina P1) è il prodotto funzionale del gene ABCB1 e fa parte della famiglia B dei trasportatori ABC. ABCB1 è un trasportatore glicoproteico di membrana espresso anche nelle cellule ematiche, incluse le cellule staminali CD34+, NK, cellule dendritiche e linfociti T e B. Numerosi sono i substrati principalmente coinvolti nel meccanismo di estrusione cellulare mediato da ABCB1: vari xenobiotici, chemioterapici (doxorubicina, vinblastina e taxani), farmaci (colchicina), peptidi, lipidi e steroli. Presenta, per questo motivo, un'importante funzione di barriera tra gli organi ed il sangue, preservandoli dall'assorbimento e dall'accumulo di sostanze potenzialmente citotossiche. Questo trasportatore è inoltre ritenuto essenziale nei processi di detossificazione cellulare, soprattutto in distretti estremamente sensibili [Nestal de Morales et al., 2012]. La sua iperespressione, è responsabile della resistenza multifarmaco e del fallimento delle terapie in pazienti sottoposti a trattamento chemioterapico, dove si ritengono svolgere

un ruolo determinante nell'estrusione dei farmaci dalle cellule bersaglio [Mahadevan & List, 2004; Chen & Sikic, 2012].

Diversi studi eseguiti in vitro hanno dimostrato che l'Imatinib, il Dasatinib ed il Nilotinib sono in grado di indurre l'espressione di ABCB1 in linee cellulari di LMC sensibili, e l'attività crescente di questa proteina è in grado di conferire resistenza ai farmaci [Mahon, et al., 2003; Hedgedus, et al., 2009]. Inoltre, pazienti in fase accelerata e trattati con Imatinib presentano un aumento delle cellule iperesprimenti ABCB1.

Inoltre, ABCB1 risulta fisiologicamente espressa nelle cellule staminali ematopoietiche come protezione verso l'accumulo di metaboliti tossici. Essendo la LMC un disordine delle cellule staminali, i progenitori leucemici possono esprimere una quantità simile, se non maggiore, di ABCB1, contribuendo alla loro sopravvivenza durante la terapia [Mahon, et al., 2003].

Nel lavoro di Hedgedus, et al., inoltre, si dimostra che Nilotinib, Dasatinib e Bosutinib presentano distinti profili di interazione con ABCB1, che possono essere determinanti nell'efficacia clinica della terapia. Queste interazioni, possono influire significativamente sulla resistenza agli inibitori delle tirosin chinasi, sia per quanto riguarda la farmacocinetica che per la tossicità ai farmaci. Il Nilotinib, il Dasatinib e il Bosutinib fungono da substrato per questa proteina e, ad elevate concentrazioni, possono inibirne l'attività [Hedgedus, et al., 2009].

Un'altra importante pompa di efflusso associata alla chemioresistenza nella LMC è ABCG2 o BCRP (Breast Cancer Resistance Protein), una proteina codificata dal gene ABCG2. Questa proteina è normalmente espressa ad elevati livelli nella placenta, nelle cellule della rete testis, della cervice uterina e nell'utero, nel fegato, negli epatociti, nel

pancreas e negli enterociti [Fetsch, et al., 2006]. I principali substrati di questa proteina sono il mitoxantrone, le camptotecine, le antracicline, gli antifolati, gli analoghi delle purine (cladribina) e gli inibitori delle tirosin-chinasi Imatinib, Erlotinib e Gefitinib [Lemos, et al., 2008].

Diversi studi in vitro hanno dimostrato che l'Imatinib a basse dosi è in grado di interagire con ABCG2, fungendo sia da substrato che modulandone l'espressione, provocando resistenza nelle cellule iperesprimenti [Burger, et al., 2004; Terezina de Lima, et al., 2014].

Nel lavoro di Terezina de Lima, si descrive come l'espressione genica di ABCG2 sia significativa nella risposta all'Imatinib, poiché nei soggetti che non raggiungono la risposta molecolare maggiore è stata riscontrata una elevata espressione del suo mRNA, in correlazione con il numero di copie di BCR-ABL, probabilmente a causa di una riduzione della concentrazione di Imatinib intracellulare nelle cellule leucemiche. Inoltre, nelle cellule staminali degli esordi di LMC si è riscontrata una più elevata espressione di mRNA di ABCG2 rispetto alle cellule staminali normali.

1.5 Il gene del tumore di Wilms 1 (WT1)

Il gene del tumore di Wilms 1 (WT1) è stato clonato nel 1990 ed è un fattore di trascrizione localizzato sul cromosoma 11p13 che agisce come oncosoppressore e riveste un ruolo fondamentale nello sviluppo del tumore di Wilms. La sua espressione caratterizza lo sviluppo dei sistemi genitourinario ed ematopoietico ed è inversamente correlato con il grado di differenziazione dei due sistemi. Nell'ematopoiesi lo si ritrova nei progenitori CD34+ ed è assente nei leucociti maturi mentre nel caso di pazienti con

LAM è possibile trovare un'alta espressione nei blasti a prova del suo coinvolgimento nella leucemogenesi [Inoue et al., 1994]. La struttura è caratterizzata dalla presenza all'N-terminale (esoni 1-6) di un dominio regolatorio e al C-terminale (esoni 7-10) di un dominio zinc-finger.

Vi sono quattro principali isoforme determinate da due varianti di splicing, una coinvolge lo splicing dell'esone 5 e l'altra riguarda lo splicing di 9 nucleotidi codificanti per tre amminoacidi che si trovano tra l'esone 9 e 10 (KTS- lisina, treonina e serina).

L'isoforma -KTS è coinvolta nella regolazione trascrizionale e l'isoforma +KTS è invece coinvolta in processi post-trascrizionali. Il ruolo preciso di WT-1 nell'ematopoiesi non è chiaro ma è sicuramente coinvolto nella regolazione della sopravvivenza cellulare, proliferazione e differenziamento e può avere un ruolo di oncosoppressore ma anche di oncogene [Yang et al., 2007].

Come suggerito dalla presenza delle quattro strutture a dita di zinco, WT1 è un fattore di trascrizione con una potente attività regolatoria. Tra i suoi numerosi target sono compresi soprattutto geni coinvolti nella proliferazione, crescita, differenziazione e apoptosi cellulare, oltre a geni per la componente extracellulare e altri fattori di trascrizione. WT1 riveste sia attività inibitoria che attivatoria, in relazione ai suoi livelli di espressione, al tipo di isoforma e al tessuto in cui viene espresso. In particolare, inibisce la trascrizione di diversi fattori di crescita tra cui PDGF, M-CSF, IGF-II, di recettori di fattori di crescita come IGF-IR e EGFR e di altri geni tra cui RAR, c-myc, c-myb, N-myc e bcl-2, ma può anche attivare la trascrizione dello stesso bcl-2 e di altri geni come Dax e RbAp46 [Yang et al, 2007].

Fisiologicamente, WT1 viene espresso durante il periodo dell'organogenesi, in cui sembra svolgere un ruolo cruciale [Armstrong et al, 1993; Yang et al, 2007].

WT1 è stato inizialmente identificato come gene con funzioni di oncosoppressore all'interno della patogenesi del tumore renale di Wilms. Esperimenti successivi hanno rafforzato l'ipotesi di un ruolo oncosoppressorio, tramite la dimostrazione dell'inibizione della crescita tumorale dopo induzione esogena dell'espressione di WT1 non mutato in topi. Probabilmente questo meccanismo è legato alla capacità di WT1 di regolare la pathway di apoptosi della cellula interagendo con diversi partner.

La funzione di WT1 nell'emopoiesi sia normale che leucemica resta ancora non del tutto chiarita. L'espressione del gene nel midollo osseo normale è estremamente bassa e confinata alle popolazioni primitive CD34 positive [Baird et al, 1997; Hosen et al, 2002]. Di fatto WT1 contribuisce verosimilmente al corretto sviluppo e differenziamento delle cellule ematopoietiche, come suggerito dalla sua iniziale iperespressione e successiva down-modulazione durante la differenziazione [Yang et al, 2007]. Altri lavori hanno studiato modelli in vitro, in cui l'espressione forzata di WT1 è stata sufficiente a indurre la proliferazione dei progenitori e ad inibire la maturazione e la differenziazione delle cellule mieloidi [Tsuboi et al, 1999].

Il ruolo di WT1 nelle patologie neoplasticheematologiche è stato sempre più indagato e numerosi autori hanno documentato una iperespressione di questo gene in vari tipi di Leucemia Acuta (Leucemia Acuta Mieloide, Leucemia Acuta Linfoblastica), nella Leucemia Mieloide Cronica e nelle Sindromi Mielodisplastiche [Bergmann et al, 1997; Brieger et al, 1994; Cilloni et al, 2003; Yang et al, 2007]. Il ruolo preciso di WT-1 nell'ematopoiesi non è chiaro ma è sicuramente coinvolto nella regolazione della

sopravvivenza cellulare, proliferazione e differenziamento e può avere un ruolo di oncosoppressore ma anche di oncogene [Yang et al., 2007].

Capitolo 2 – SCOPO DELLA TESI

L'introduzione degli inibitori delle tirosin-chinasi (TKI) ha rivoluzionato la gestione e le prospettive della leucemia mieloide cronica. In particolare, l'utilizzo dell'inibitore Imatinib in prima linea in pazienti affetti da Leucemia Mieloide Cronica (LMC) in fase cronica ha permesso di ridurre drasticamente la necessità di ricorrere al trapianto di cellule staminale allogeniche, e di prolungare notevolmente la sopravvivenza. Tuttavia, nonostante gli eccellenti risultati, circa un terzo dei pazienti trattati con Imatinib interrompe la terapia a causa di una risposta inadeguata o tossicità [de Lavallade H, et al., 2008]. Nuovi TKI più potenti, i TKIs di seconda generazione (2g-TKIs), quali Dasatinib e Nilotinib, possono essere efficaci dopo il fallimento del trattamento con Imatinib.

I maggiori studi sulle LMC hanno evidenziato che il raggiungimento di una risposta profonda e rapida a questi farmaci rappresenta un fattore prognostico molto importante per l'outcome dei pazienti [Baccarani, et al., 2013; Hochhaus, et al., 2016]. Infatti, i pazienti con risposte meno tempestive e meno profonde presentano poi risposte cliniche transitorie, e un maggior rischio di sviluppare mutazioni con resistenze di tipo BCR-ABL-dipendente [Soverini, et al., 2014].

Attualmente, il raggiungimento di una risposta molecolare profonda e precoce è il principale target della ricerca nell'ambito della terapia della LMC con TKIs, anche alla luce degli alti costi dei farmaci di seconda e terza generazione. Pertanto abbiamo deciso di ricercare possibili fattori precoci predittivi della risposta ai TKIs in modo da

poter indirizzare precocemente il clinico verso il trattamento che può offrire per ciascun paziente il miglior outcome.

A tal fine abbiamo indagato marcatori predittivi di risposta ai TKIs che fossero rapidamente disponibili per l'uso clinico, quali gli score clinici, il tipo di trascritto del gene di fusione BCR-ABL, i livelli di espressione delle proteine di trasporto ABCB1 e ABCG2 e l'espressione del gene WT1.

Capitolo 3 – MATERIALI E METODI

3.1 Materiali

3.1.1 Pazienti oggetto di studio

I pazienti oggetto di studio sono 64 casi di Leucemia Mieloide Cronica clinicamente diagnosticati in fase cronica presso la Clinica Ematologica di Udine, Trieste e Latisana tra il 2012 e il 2017. Nonostante una prima diagnosi basata su parametri clinici sia stata effettuata presso centri esterni, l'indagine molecolare della presenza del gene di fusione BCR-ABL e i successivi monitoraggi della malattia minima residua sono stati effettuati presso il nostro laboratorio in quanto centro di riferimento LabNet CML della fondazione Gimema. Tutte le analisi sono state effettuate in modo retrospettivo su campioni precedentemente conservati per il monitoraggio consigliato nella buona pratica clinica e nelle linee guida internazionali dei pazienti affetti da LMC.

3.1.2 Linea cellulare

La linea cellulare K562 è una linea immortalizzata di crisi blastica di LMC, BCR-ABL p210 positiva. Per questa sua peculiarità, è stata scelta come calibratore utile alla determinazione dell'espressione dei geni ABCB1 e ABCG2 nella quantificazione relativa mediante metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Per il nostro studio la linea cellulare K562 è stata coltivata in terreno di coltura RPMI supplementato con il 10% di siero fetale bovino in incubatore a 37°C e 5% di CO₂ fino al nostro utilizzo.

Dalle cellule K562 abbiamo estratto l'RNA totale, mediante le metodiche di estrazione e quantificazione successivamente descritte.

3.2 Metodi

3.2.1 Separazione mediante buffy-coat e stoccaggio

Per tutte le nostre indagini è stata utilizzata una procedura che prevede una doppia purificazione del sangue periferico in EDTA: buffy-coat e buffer di lisi per ottenere l'intera frazione di cellule nucleate con una minima contaminazione di piastrine e globuli rossi (pellet cellulare).

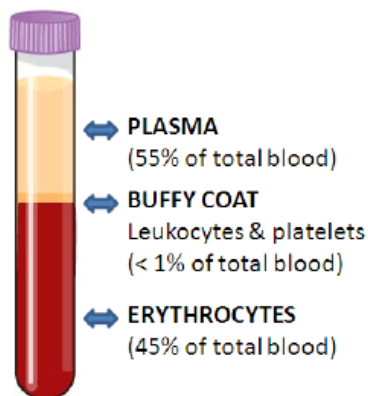


Figura 3.1. Separazione mediante buffy-coat di una provetta di sangue in EDTA.

Sono, quindi, stati utilizzati campioni di sangue periferico raccolti in EDTA per un volume totale pari a 20 mL per ogni paziente (come da linee guida LabNet). Dopo la centrifugazione (2800 rpm per 10 minuti) viene raccolto l'anello di globuli bianchi (buffy-coat), posizionato nell'interfaccia tra globuli rossi e plasma, dispensato in due

provette a fondo tondo da 10 mL, e infine diluito portando inizialmente a 3mL con tampone PBS e successivamente a 10 mL con l'RBC Lysis Solution (Qiagen), invertendo delicatamente per favorire la lisi dei globuli rossi. Le provette vengono messe ad incubare in frigo (2-8 °C) per circa 30 minuti, mescolando per inversione ogni 10 minuti. Allo scadere del tempo si mescola per inversione per 1 minuto e si centrifuga per 10 minuti a 2800 rpm a temperatura ambiente, affinché i globuli bianchi precipitino e nel sopranatante restino i globuli rossi lisati che possono essere eliminati. Si eseguono due lavaggi risospendendo il pellet in 10 mL di tampone PBS e centrifugando per 4 minuti a 1900 rpm. Prima del secondo lavaggio si preleva un'aliquota di campione per procedere alla conta con la macchina contaglobuli. Dopo aver ottenuto la frazione di cellule desiderata bisogna procedere tempestivamente allo stoccaggio per evitare che le nucleasi presenti all'interno del campione danneggino il materiale d'interesse, ossia l'mRNA. Quindi, dopo il secondo ciclo di centrifuga, il campione viene risospeso e aliquotato in provette da 2 mL RNase/DNase free per un massimo di 12×10^6 cellule per ciascuna provetta. Si centrifuga nuovamente per 1 minuto a 8000 rpm, poi viene eliminato per inversione il tampone PBS, ed infine si procede aggiungendo 350 μ l di Buffer RLT. Si tratta di una soluzione di Sali di Guanidino Isotiocianato e β -mercaptoetanolo; il primo è un composto in grado di inibire le RNasi, al quale si affianca l'azione del β -mercaptoetanolo che denatura le proteine rompendo i ponti disolfuro, indispensabili per il mantenimento della struttura dell'enzima RNasi. A questo punto, per facilitare il processo di lisi cellulare, si esercita uno stress meccanico, precisamente si omogeneizza il campione mediante

aghi da 25 gauge (siringhe da insulina) ed infine si conserva a -20°C fino al momento dell'estrazione.

3.2.2 Estrazione RNA e valutazione della sua integrità e concentrazione

Per l'estrazione dell'RNA a partire dai campioni risospesi in Buffer RLT abbiamo utilizzato il kit commerciale RNeasy Mini Kit (Qiagen) che fornisce colonne con membrana di silice e sfrutta il legame dell'RNA a tale membrana.

Per prima cosa è necessario scongelare i campioni a temperatura ambiente per circa 15 minuti. A questo punto si procede aggiungendo un volume di etanolo al 70%, avente la funzione di facilitare il legame dell'RNA al filtro della colonnina utilizzata per l'estrazione. Dopo aver trasferito i circa 700 µL totali del campione all'interno della colonna, si centrifuga 30 secondi a 13000rpm per far legare l'RNA alle membrane, mentre vengono eluiti e scartati sia il Buffer RLT che l'etanolo. Si procede poi lavando il filtro con appositi buffer forniti dal kit di estrazione (RW1 e RPE) che hanno lo scopo di eliminare contaminanti e i residui di DNA, la cui digestione è stata effettuata mediante l'enzima DNAsi. L'RNA viene infine eluito in 50 o 35 µL, a seconda della cellularità e della concentrazione voluta, e conservato a -20°C fino al momento della quantificazione. Quest'ultima viene effettuata mediante spettrofotometro NanoDrop, uno strumento che permette di misurare l'assorbanza dell'RNA a 260 nm partendo da volumi molto piccoli (0,5-2µl) di campione con grande accuratezza e riproducibilità. Lo strumento è dotato di un piedistallo in cui è presente la fibra ottica ricevente e sul quale viene appoggiata la quantità di campione che, grazie alla tensione superficiale, è mantenuta in sede. Sul braccio dello strumento è presente la seconda fibra ottica,

sorgente, che viene portata in contatto con il piedistallo così da intrappolare il campione tra le due fibre ottiche e permettere il passaggio del raggio di luce della lampada allo xenon. A questo punto lo spettrofotometro può misurare la quantità di luce che ha attraversato il campione e di conseguenza la concentrazione dell'RNA. Viene visualizzata la curva dell'assorbanza in funzione della lunghezza d'onda per valutare la purezza dell'RNA:

- rapporto A260/A280 misura la purezza dell'RNA rispetto a contaminanti come le proteine → tale rapporto è ottimale se compreso tra 1.9 e 2.1;
- rapporto A260/A230 valuta la presenza di contaminanti organici quali fenoli e residui di estrazione → deve essere maggiore di 2.

3.2.3 RT-PCR qualitativa

La retrotrascrizione (Reverse Transcription PCR – RT-PCR) è una tecnica di PCR che consente di retrotrascrivere l'RNA presente nel campione in cDNA. Questa tecnica prevede l'utilizzo della trascrittasi inversa, un enzima multifunzionale con 2 distinte attività enzimatiche: una DNA polimerasi RNA-dipendente che sintetizza una catena di DNA complementare dallo stampo di mRNA, ed una esoribonucleasi ibrido dipendente (RNasi H) che degrada l'RNA in un ibrido RNA-DNA. La combinazione di queste due attività consente la sintesi di una molecola di DNA copia a singolo filamento (cDNA). Questa reazione è stata effettuata applicando il protocollo BIOMED-1, inserito nell'articolo di van Dongen et al. *“Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease”* che prevede la retrotrascrizione di una quantità pari a 1 µg di RNA,

allo scopo di ottenere risultati comparabili fra i diversi campioni. Questo volume di RNA deve essere aggiunto alla mix di reazione mostrata nella tabella 3.1.

| Reattivi | Concentrazione finale |
|------------------------|------------------------------|
| MgCl ₂ 25mM | 5 mM |
| RT buffer 10x | 1x |
| DTT 100 mM | 10 mM |
| dNTPs 100 mM | 1 mM |
| Random hexam. 50 µM | 5 µM |
| MuLV 50 U/µL | 200 U |

Tabella 3.1 Mix di reazione RT-PCR BIOMED-1

si procede poi con il protocollo termico costituito da tre fasi:

- 10' a 20°C (*fase di annealing*)
- 45' a 42°C (*fase di retrotrascrizione*)
- 3' a 99°C (*fase di denaturazione*)
- ∞ a 4°C

al termine di queste tre fasi i campioni devono essere portati immediatamente a - 20°C. Dopo la retrotrascrizione il metodo impostato da van Dongen secondo protocollo BIOMED-1 prevede 3 step di amplificazione che permettono l'aumento della sensibilità del test e la conferma dei risultati ottenuti. Nel nostro studio ci siamo limitati al primo step di PCR che amplifica la sequenza retrotrascritta di BCR-ABL p210 e di ABL. Questa metodica prevede l'utilizzo di una mix di reattivi, mostrata nella tabella 3.2, alla quale aggiungere il cDNA, pari al 15% del volume finale di retrotrascrizione.

| Reattivi | Concentrazione finale |
|------------------------|------------------------------|
| MgCl ₂ 25mM | 2,5 mM |
| RT Buffer 10x | 1x |
| dNTPs 100 mM | 200 µM |
| Primers 100 µL FW | 400 nM |
| Primers 100 µL RV | 400 nM |
| Taq pol. Enzyme 5 U/µL | 1 U/50µL |

Tabella 3.2 Mix di reazione PCR BIOMED-1

Di seguito vengono riportate le sequenze dei primers specifici utilizzati:

| | posizione 5' | T° melting |
|---|--------------|------------|
| <i>primer ABL forward</i> : CTT CTC GCT GGA CCC AGT GA | 306 (Abl) | 61,54 |
| <i>primer ABL reverse</i> : TGT GAT TAT AGC CTA AGA CCC GGT | 432 (Abl) | 60,69 |
| <i>primer p210 forward</i> : GAA GTG TTT CAG AAG CTT CTC C | 3086 (Bcr) | 57,26 |
| <i>primer p210 reverse</i> : GTT TGG GCT TCA CAC CAT TCC | 458 (Abl) | 62,67 |

Figura 3.1 Primer per analisi RT-PCR di *t(9; 22) (q34; q11)* con il gene di fusione *p210 BCR-ABL*

Una volta preparata la mix si procede poi con il seguente protocollo termico:

- 95°C per 30 secondi (*fase di melting*)
 - 94°C per 30 secondi (*fase di melting*)
 - 65°C per 60 secondi (*fase di annealing*)
 - 72°C per 60 secondi (*fase di estensione*)
 - STOP PCR a 16°C o a temperatura ambiente
- } 35 cicli

Infine l'amplificazione mediante PCR è stata rilevata mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2%, tecnica utilizzata per separare e analizzare acidi nucleici, sfruttando le cariche presenti nelle molecole di DNA, in modo tale da farlo migrare in un campo elettrico attraverso un gel. Questo, essendo costituito da una maglia di polisaccaridi, consente di separare le molecole in base alla loro grandezza: quelle più piccole attraversano più velocemente i pori rispetto a quelle più grandi. In questo modo si avrà una separazione in funzione della velocità. I valori attesi secondo i trascritti identificabili con la metodica BIOMED-1 sono i seguenti:

| p210 | I round | ABL |
|-------------|---------|--------|
| b3a2 | 417 bp | 127 bp |
| b2a2 | 342 bp | |

Figura 3.2 Paia di basi attese per i trascritti identificabili con la metodica BIOMED-1

3.2.4 Real Time PCR quantitativa

3.2.4.1 Saggio BCR-ABL

L'RNA di partenza è stato retrotrascritto a DNA copy (cDNA) utilizzando il kit commerciale RT Kit Ipsogen (Qiagen) allineato alla procedura di retrotrascrizione riportata da Gabert [Gabert et al., 2003].

La Quantitative Real Time PCR da noi svolta prevede l'utilizzo del kit BCR-ABL Mbcr IS-MMR Ipsogen (Qiagen) progettato in conformità agli studi "Europe Against Cancer" [Gabert et al., 2003]. Il kit è un test quantitativo in vitro che rivela i trascritti p210 BCR-ABL (Mbcr) nell'mRNA totale estratto dai campioni di sangue periferico dei pazienti LMC in fase cronica.

I campioni sono stati testati in duplicato sia per BCR-ABL sia per ABL, inoltre, per verificare l'attendibilità e l'assenza di contaminazioni durante i processi implicati nello studio, in ciascuna piastra sono stati inseriti in doppio i controlli privi di template (Not Template Controls - NTC).

La reazione viene effettuata sullo strumento 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems) con un volume finale di 25 μ l (inoculando 200ng di RNA retrotrascritto), con il seguente protocollo termico:

| Temperatura | Tempo | Cicli |
|-------------|---------|-------|
| 50°C | 2 min. | x1 |
| 95°C | 10 min. | x1 |
| 95°C | 15 sec. | x50 |
| 60°C | 1 min. | x50 |

Abbiamo utilizzato plasmidi contenenti entrambi i trascritti per garantire la medesima stabilità ed efficienza del gene di interesse e di controllo; nel dettaglio per il gene BCR-

ABL sono previste 5 diluizioni (10^6 , 10^5 , 10^3 , 10^2 , 10^1 copie) e 4 diluizioni per il gene ABL (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 copie).

Al termine della PCR, sono stati raccolti i dati valutando innanzitutto la qualità della curva plasmidica, detta curva standard, in termini di slope e di coefficiente di correlazione. Esperimenti con slope <-3.6 o >-3.2 o con coefficiente di correlazione <0.990 sono stati rifiutati e ripetuti.

3.2.4.1 Saggio ABCB1 e ABCG2

L'RNA dei casi oggetto di studio è stato retrotrascritto a cDNA mediante RT in accordo con BIOMED-2. I campioni sono poi stati quantificati con saggio RQ-PCR con chimica TaqMan inoculando 100ng di RNA retrotrascritto, in quantificazione relativa mediante metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [Livak & Schmittgen, 2001]. Nel dettaglio è stato calcolato il $2^{-\Delta C_t}$, dove l'esponente è pari alla differenza tra il C_t medio del gene di interesse (ABCB1 o ABCG2) ed il C_t medio del gene normalizzatore (ABL), per ogni campione. L'analisi si completa dividendo il $2^{-\Delta C_t}$ di ciascun campione per il $2^{-\Delta C_t}$ del campione usato come calibratore, ottenendo in questo modo il $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Come calibratore è stata utilizzata l'espressione di ABCB1 e ABCG2 nella linea cellulare K562.

I primers e i probe specifici sia per i geni da testare sia per il gene di controllo (ABL) sono stati disegnati grazie al software Primer Express (Applied Biosystems) e validati con Primer Blast per la validazione:

| | T° melting |
|--|------------|
| Primer forward: GCTCATCGTTTGTCTACAGTTCGT | 59 |
| Primer reverse: ACAATGACTCCATCATCGAAACC | 59 |
| Probe: FAM-ATGCTGACGTCATCGC-MGB | 69 |

Figura 3.3 Primers e probe ABCB1

| | <u>T° melting</u> |
|--|-------------------|
| Primer forward: CGACCTGCCAATTTCAAATGTA | 59 |
| Primer reverse: TCAGAGTGCCCATCACAACATC | 60 |
| Probe: FAM-TTCAGGTTACGTGGTACAAG-MGB | 69 |

Figura 3.4 Primers e probe ABCG2

La reazione di real-time PCR quantitativa è stata allestita in un volume finale di 25 µL:

| Reattivi | Concentrazione finale |
|-------------------------|------------------------------|
| Universal Master Mix 2x | 1x |
| Primer FW 15 µM | 900 nM |
| Primer RV 15 µM | 900 nM |
| Probe 5 µM | 250 nM |

Tabella 3.3 Mix di reazione Real-time PCR quantitativa

Le curve di efficienza, precedentemente testate, hanno ottenute presentano una efficienza pari a circa 1.

3.2.4.1 Saggio WT1

L'analisi dell'espressione del gene WT-1 è stata condotta utilizzando un saggio di RQ-PCR sullo strumento 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems) su campioni precedentemente retrotrascritti usando la metodica BIOMED-2. Le miscele di primers necessarie per la reazione e le curve plasmidiche, indispensabili per effettuare la quantificazione assoluta delle copie del gene presenti nel campione biologico, sono state acquistate sotto forma di kit per evitare possibili contaminazioni da DNA plasmidico. Si tratta del ProfileQuant Kit ELN Ipsogen (Qiagen), disegnato in accordo alle indicazioni fornite dall'European LeukaemiaNet e alle procedure di standardizzazione del metodo a livello internazionale [Cilloni et al., 2009; Beillard et al., 2003]. La metodica prevede l'utilizzo di hydrolysis probe con la chimica TaqMan. Il saggio è stato studiato per essere localizzato sulla giunzione esonica 1 e 2; il probe

fluorescente è marcato con 6-carbossifluoresceina (FAM) come reporter a livello dell'estremità 5' e come quencher il 6-carbossitetrametilrodamina (TAMRA) all'estremità 3'. Le sequenze usate sono quelle pubblicate da Van Dijk e prevedono [van Dijk et al., 2002]:

- **PrimerWT1 Forward** 5'-CGCTATTCGCAATCAGGGTTA-3' sulla giunzione esonica 1-2;
- **PrimerWT1 Reverse** 5'-GGGCGTGTGACCGTAGCT-3' sull'esone 2;
- **ProbeWT1** 5'-AGCACGGTCACCTTCGACGGGA-3' sull'esone 2.

La curva standard, per la calibrazione e la quantificazione del gene, viene ottenuta tramite diluizioni seriate da 10^6 a 10^1 molecole di plasmidi linearizzati ottenuti dal clonaggio della sequenza di WT-1 Ipsogen (Qiagen). Nella quantificazione assoluta infatti, si determina il numero di copie del trascritto del gene di interesse interpolando il segnale di fluorescenza del campione con i valori della curva standard e la sensibilità del saggio in RQ-PCR per WT1 è stata sempre in grado di rilevare 10 molecole plasmidiche [Gabert et al., 2003].

Secondo le indicazioni di Gabert et al., [Gabert et al., 2003] e secondo le linee guida del Profile Quant Kit, il numero di copie assolute di WT1 è stato poi normalizzato rispetto al numero di copie del gene di riferimento interno Abelson (ABL) ed espresse come numero di copie di WT1 su 10^4 copie di ABL ($WT1/ABL \times 10^4$) [Cilloni et al., 2007; Beillard et al., 2003]. Tutte le determinazioni sono state effettuate in duplicato e i risultati che hanno mostrato una discrepanza maggiore ad un Ct tra i due replicati sono stati esclusi e ripetuti. Sono stati utilizzati regolarmente gli adeguati controlli negativi per verificare l'assenza di contaminazioni. Infine i campioni contenenti meno di 1000 copie di ABL sono stati considerati degradati e inadeguati per l'analisi.

3.2.5 Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata eseguita con il software *GraphPad Prism* versione 6.

L'associazione tra le variabili biologiche è stata valutata con analisi di regressione logistica. Le variabili continue sono state confrontate con il test non parametrico a due code di tipo Mann Whitney U test nel confronto tra due gruppi e di tipo Kruskal-Wallis test per confronti tra più di due gruppi. Le variabili dicotomiche sono state analizzate con il test esatto di Fisher. La significatività statistica è stata considerata per p values ≤ 0.05 (*); $P \leq 0.01$ (**); $P \leq 0.001$ (***)).

Per la determinazione dei valori soglia è stata effettuata l'analisi di curva di ROC.

Capitolo 4 – RISULTATI

4.1 Caratterizzazione dei pazienti oggetto di studio

La popolazione oggetto di studio conta 64 pazienti con Leucemia Mieloide Cronica in fase cronica sui quali sono state effettuate valutazioni cliniche che comprendono la raccolta di informazioni relative alla storia personale, l'esame clinico e i prelievi per i test molecolari secondo modalità e tempistiche della consolidata pratica clinica.

| Popolazione totale (64 pazienti) | |
|---|---------------------|
| Maschi 41 (64%) | Femmine 23 (36%) |
| Età all'esordio (anni) | |
| Media (\pm dev.std.) | 55 (\pm 17.5) |
| Mediana (range) | 59 (19-81) |

Tabella 4.1. *Dati demografici della popolazione oggetto di studio.*

Sono state valutate alcune delle principali caratteristiche cliniche con un riconosciuto impatto prognostico all'esordio: età, dimensione della milza, numero di cellule blastiche, piastrine e globuli bianchi ed emoglobina. In particolare sulla base di questi sono stati calcolati gli indici prognostici Sokal, Hasford, ELTS che hanno reso possibile la suddivisione dei pazienti in tre gruppi di rischio: basso, intermedio e alto. Non è stato possibile individuare questi score per tutti i pazienti in quanto per alcuni di essi la diagnosi è stata effettuata presso strutture esterne (Tabella 4.2).

| <i>Rischio</i> | <i>Sokal</i> | <i>Hasford</i> | <i>ELTS</i> |
|-------------------|--------------|----------------|-------------|
| <i>Basso</i> | 38% | 40% | 60% |
| <i>Intermedio</i> | 46% | 51% | 32,5% |
| <i>Alto</i> | 16% | 9% | 7,5% |

Tabella 4.2. *Indici Sokal, Hasford e ELTS al momento della diagnosi, prima di iniziare il trattamento con LMC.* Per il punteggio Sokal e ELTS sono richiesti età, dimensioni della milza, conta piastrinica e di cellule blastiche nel sangue periferico [Sokal JE et al, Blood 1984; 63: 789-799. Pffirmann M et al, Leukemia. 2016 Jan;30(1):48-56.]. Per il punteggio Hasford sono necessarie anche la percentuale di eosinofili e basofili nel sangue [Hasford J et al, JNTL Cancer Inst 1998; 90: 850-858].

La conferma della diagnosi di LMC di ogni singolo soggetto è stata effettuata attraverso l'identificazione dell'alterazione cariotipica a livello del cromosoma Philadelphia e l'analisi dei livelli di trascritto del risultante gene di fusione BCR-ABL, effettuata mediante Real-Time PCR (RQ-PCR). Dal nostro studio, abbiamo evidenziato che tutti i pazienti sono risultati positivi per l'espressione del gene BCR-ABL. Come indicato in tabella 4.3, i risultati finali sono espressi come % BCR-ABL/ABL in International Scale (IS); dai nostri risultati possiamo vedere che la nostra coorte di pazienti ha dato livelli di espressione con valore medio di 77,4430% e valore mediano pari a 70,2417%. È importante ricordare che tutte le variabili riportate fino ad ora sono state valutate prima dell'inizio di qualsiasi terapia.

| <i>Espressione del gene BCR-ABL all'esordio</i> | |
|--|-------------------------|
| Media (\pm dev.std.) | 77,4430 % (\pm 35.4) |
| Mediana (range) | 70,2417 % (30-203) |

Tabella 4.3. *Espressione del gene di fusione BCR-ABL nella popolazione oggetto di studio.*

Una volta accertata la diagnosi e valutati i vari indici prognostici, il clinico procede alla scelta dell'approccio terapeutico. In particolare nella nostra casistica il farmaco che è stato somministrato nella maggior parte dei casi è l'Imatinib (69%), seguito da inibitori tirosin-chinasi (TKIs) di seconda generazione quali il Nilotinib (22%) e dal Dasatinib

(8%). Solo in un caso è stato somministrato il Ponatinib, farmaco di terza generazione (tabella 4.4).

| <i>Tipo di TKI scelto in prima linea</i> | <i>n.paz.(%)</i> |
|--|------------------|
| Imatinib | 44 (69%) |
| <i>Dasatinib</i> | 5 (8%) |
| Nilotinib | 14 (22%) |
| <i>Ponatinib</i> | 1 (2%) |

Tabella 4.4. *Trattamento di prima linea in fase cronica nella popolazione oggetto di studio.*

Durante il primo anno di terapia, 8 pazienti su 64 hanno dovuto cambiare il farmaco scelto in prima linea a causa di intolleranze o di una resistenza al farmaco; questo ha comportato la loro esclusione nelle analisi a diversi time-point poiché avviati ad una terapia di seconda linea.

Infine sui pazienti di cui avevamo a disposizione il rischio degli indici prognostici, abbiamo valutato la scelta da parte del clinico del tipo di TKI in prima linea (tabella 4.5).

| Rischio | Sokal | | | Hasford | | | ELTS | | |
|-----------------|--------------|----------|----------|----------------|----------|----------|-------------|----------|----------|
| | <i>A</i> | <i>I</i> | <i>B</i> | <i>A</i> | <i>I</i> | <i>B</i> | <i>A</i> | <i>I</i> | <i>B</i> |
| Imatinib | 17% | 59% | 86% | 0% | 67% | 71% | 33% | 62% | 75% |
| 2g-TKIs | 83% | 41% | 14% | 100% | 33% | 29% | 67% | 38% | 25% |

Tabella 4.5. *Trattamento di prima linea nella popolazione oggetto di studio stratificata per rischio secondo i principali indici prognostici (A=alto, I= intermedio, B=basso).*

4.2 Analisi del tipo di trascritto BCR-ABL

Oltre al livello di trascritto BCR-ABL, è stato quindi valutato il tipo di trascritto BCR-ABL espresso all'esordio nei 64 pazienti oggetto di studio, mediante RT-PCR qualitativa.

Come mostrato in tabella 4.6, la variante di trascritto *b3a2* è stata rilevata nel 56% dei casi, mentre il trascritto *b2a2* ha mostrato una frequenza del 39%. La presenza di entrambi i trascritti (*b3a2* e *b2a2*) è stata evidenziata nel 5% dei casi.

| Tipo di trascritto all'esordio | |
|--------------------------------|-------------|
| <i>b2a2</i> (e13a2) | 25/64 (39%) |
| <i>b3a2</i> (e14a2) | 36/64 (56%) |
| Entrambi | 3/64 (5%) |

Tabella 4.6 Caratterizzazione del tipo di trascritto all'esordio.

Dopodiché abbiamo proceduto con l'analisi del tipo di trascritto, che è stato caratterizzato all'esordio, in relazione alla risposta ai TKIs nei tre *time-points* richiesti dalle raccomandazioni europee *LeukemiaNet*: 3 mesi, 6 mesi e 12 mesi (tabella 4.7).

| | 3 months | | p | 6 months | | | p | 12 months | | | p |
|--------------------|----------------------------|----------------------------|-------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|-------|
| | Optimal BCR-ABL ≤10% | Warning BCR-ABL >10% | | Optimal BCR-ABL <1% | Warning BCR-ABL 1-10% | Failure BCR-ABL >10% | | Optimal BCR-ABL ≤0,1% | Warning BCR-ABL 0,1-1% | Failure BCR-ABL >1% | |
| <i>b2a2</i> | 17 | 8 | 0,506 | 16 | 5 | 4 | 0,614 | 12 | 6 | 6 | 0,244 |
| <i>b3a2</i> | 26 | 10 | | 23 | 6 | 4 | | 20 | 5 | 4 | |
| <i>b2a2 + b3a2</i> | 3 | 0 | | 3 | 0 | 0 | | 3 | 0 | 0 | |

Tabella 4.7 Tipo di trascritto in relazione alla risposta ai TKIs. La tabella mostra il numero di casi che hanno un determinato tipo di sub-variante del gene di fusione e la loro risposta alla terapia, valutata a 3, 6 e 12 mesi; i pazienti definiti failure non hanno necessariamente modificato il trattamento. P-value determinato mediante test chi-quadro.

Come si può vedere dalla tabella 4.7, la frequenza del tipo di varianti del gene di fusione è simile tra i pazienti che presentano diversa risposta ai TKIs (*Optimal, Warning, Failure*).

Anche effettuando un'analisi separando i pazienti trattati in prima linea con Imatinib da quelli trattati con 2g-TKIs non è stata evidenziata alcuna relazione significativa tra la risposta e il tipo di trascritto.

4.3 Analisi dell'espressione dei geni ABCB1 e ABCG2

È noto che i geni ABCB1 e ABCG2 codificano per due proteine di trasporto che interagiscono con gli inibitori della tirosin-chinasi (TKI) e in particolare alcuni studi hanno mostrato il loro coinvolgimento nell'efflusso dei TKI riducendo in questo modo l'efficacia del trattamento [Eadie et al. 2017; Dohse et al. 2010].

Pertanto, su 46 pazienti della nostra casistica iniziale abbiamo analizzato i livelli di espressione dei trascritti ABCB1 e ABCG2. La quantificazione relativa dei diversi trascritti è stata valutata mediante RT-qPCR seguita dall'analisi dei dati applicando il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [Livak e Schmittgen, 2001]. Nello specifico il calibratore è stato calcolato sulla linea cellulare K562, considerato come gruppo di controllo utile ad uniformare i risultati, il cui valore medio di $2^{-\Delta Ct}$ si è rivelato pari a 0,3952 per ABCB1 e 0,0037 per ABCG2.

Dato che il trattamento stimola l'espressione di questi 2 proteine che fungono da estrusori del farmaco, la nostra analisi ha valutato anche l'andamento dei livelli di espressione di ABCB1 e ABCG2, oltre che all'esordio, anche ai time-point caratteristici del monitoraggio della malattia minima residua.

È emerso che nell'intera popolazione di studio, la proteina ABCB1 all'esordio presenta un'espressione media di 0,1845, valore che aumenta progressivamente fino a raggiungere livelli di espressione pari a 1,0747 a 12 mesi dall'inizio dell'assunzione del farmaco (tabella 4.8).

| | Espressione di ABCB1 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) | | | |
|----------------------------|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | esordio | +3 mesi | +6 mesi | +12 mesi |
| Media (\pm dev.std.) | 0,1845 (\pm 0,23) | 0,9336 (\pm 0,49) | 0,9165 (\pm 0,37) | 1,0747 (\pm 0,47) |
| Mediana (range) | 0,0974 (0,0057-1,1878) | 0,9128 (0,2217-3,0029) | 0,8702 (0,0622-1,7283) | 1,0724 (0,4252-2,8057) |

Tabella 4.8 Livelli di espressione della proteina di trasporto ABCB1 all'esordio e a diversi time-point (3, 6, 12 mesi) dei pazienti oggetto di studio.

Per quanto riguarda ABCG2, invece, è stato evidenziato che all'esordio i livelli di espressione di questo trascritto sono superiori a quelli di ABCB1 con un valore medio pari a 1,891. Successivamente abbiamo osservato l'incremento dell'espressione di ABCG2 fino a un valore medio di 16,4079 dopo 3 mesi di terapia, per poi decrescere intorno a un livello di 8, a 6 e 12 mesi (tabella 4.9).

| | Espressione di ABCG2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) | | | |
|----------------------------|---|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | esordio | +3 mesi | +6 mesi | +12 mesi |
| Media (\pm dev.std.) | 1,8910 (\pm 1,93) | 16,4079 (\pm 44,62) | 8,0815 (\pm 7,66) | 8,7476 (\pm 7,26) |
| Mediana (range) | 1,2345 (0,2153-9,6549) | 6,2691 (1,2669-276,5236) | 5,2680 (1,8343-38,9691) | 5,8597 (1,4472-30,7446) |

Tabella 4.9 Livelli di espressione della proteina di trasporto ABCG2 all'esordio e a diversi time-point (3, 6, 12 mesi) dei pazienti oggetto di studio.

È stata poi valutata l'espressione dei trascritti di ABCB1 e ABCG2 a tutti i *time-points* considerati (esordio, 3, 6 e 12 mesi) dividendo la popolazione in due sottogruppi, secondo la risposta precoce alla terapia:

- *Responding* = pazienti che a 3 mesi hanno raggiunto un'espressione del trascritto di BCR-ABL inferiore o uguale al 10%;

- *Non responding* = pazienti che a 3 mesi hanno un'espressione del trascritto BCR-ABL maggiore del 10%.

Per quanto riguarda ABCB1, come possiamo vedere dalla tabella 4.10 e successivamente dal grafico 4.1, l'espressione si è rilevata simile nei due sottogruppi di pazienti pur avendo una differente risposta alla terapia.

| Espressione di ABCB1 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) | | | | | | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|
| | Esordio | | +3 mesi | | +6 mesi | | +12 mesi | |
| | media | mediana | media | mediana | media | mediana | media | mediana |
| Responding | 0,1965 | 0,1054 | 0,8590 | 0,8959 | 0,9545 | 0,8921 | 1,1250 | 1,0870 |
| Non responding | 0,1504 | 0,0350 | 1,2228 | 1,0469 | 0,7813 | 0,8158 | 0,9015 | 0,9217 |

Tabella 4.10 Media e mediana dei livelli di espressione della proteina di trasporto ABCB1 all'esordio e a diversi time-point dei pazienti che a tre mesi sono considerati: *responding* (BCR-ABL $\leq 10\%$) e *non responding* (BCR-ABL $> 10\%$).

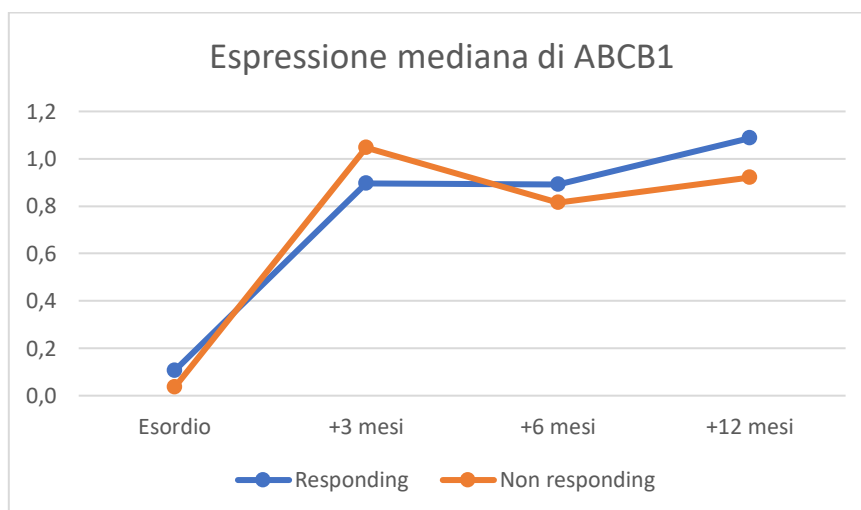


Grafico 4.1 Rappresentazione dei valori mediani dei livelli di espressione della proteina di trasporto ABCB1 dall'esordio ad un anno dall'inizio della terapia in due popolazioni: *responding* (BCR-ABL $\leq 10\%$) e *non responding* (BCR-ABL $> 10\%$).

Osservando la tabella 4.11 e il grafico 4.2 possiamo vedere che l'espressione del trascritto ABCG2 si è, invece, dimostrata molto diversa tra la popolazione "*Responding*" rispetto alla "*Non Responding*". In particolare la massima differenza tra i due gruppi si nota a 3 mesi (media 7,9593 vs 49,1463) e successivamente a 12 mesi (media 6,9499 vs 14,9396) dall'inizio del trattamento ($P = 0,048$).

| Espressione di ABCG2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) | | | | | | | | |
|---|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|---------|
| | Esordio | | +3 mesi | | +6 mesi | | +12 mesi | |
| | media | mediana | media | mediana | media | mediana | media | mediana |
| Responding | 1,8048 | 1,3648 | 7,9593 | 4,6533 | 7,2646 | 4,8540 | 6,9499 | 4,8880 |
| Non responding | 2,1352 | 1,1435 | 49,1463 | 10,7402 | 10,9860 | 8,0459 | 14,9396 | 11,3393 |

Tabella 4.11 Media e mediana dei livelli di espressione della proteina di trasporto ABCG2 all'esordio e a diversi time-point dei pazienti che a 3 mesi sono considerati: responding ($BCR-ABL \leq 10\%$) e non responding ($BCR-ABL > 10\%$).

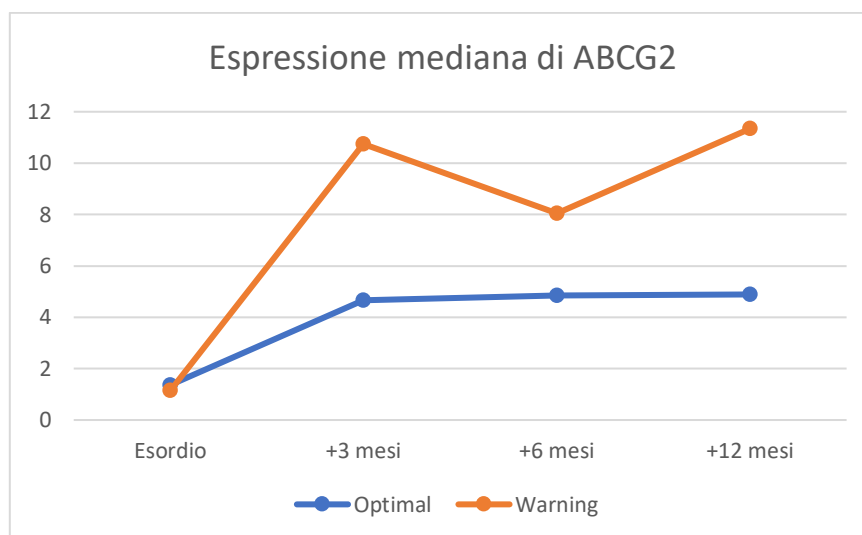


Grafico 4.2 Rappresentazione dei valori mediani dei livelli di espressione della proteina di trasporto ABCG2 dall'esordio ad un anno dall'inizio della terapia in due popolazioni: responding ($BCR-ABL \leq 10\%$) e non responding ($BCR-ABL > 10\%$).

Vista la maggiore discrepanza significativa tra le due popolazioni divise rispetto alla risposta precoce, abbiamo deciso di approfondire l'indagine valutando l'espressione di ABCG2 suddividendo la casistica in tre sottopopolazioni secondo la risposta più tardiva (12 mesi):

- *Optimal* = casi che a 12 mesi dall'inizio della terapia hanno un trascritto di $BCR-ABL \leq 0,1\%$;
- *Warning* = casi che a 12 mesi dall'inizio della terapia hanno un trascritto compreso tra $0,1-1\%$;
- *Failure* = casi che a 12 mesi dall'inizio della terapia avevano un trascritto maggiore dell'1%.

| | Espressione di ABCG2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) | | | | | | | |
|----------------|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|
| | Esordio | | +3 mesi | | +6 mesi | | +12 mesi | |
| | media | mediana | media | mediana | media | mediana | media | mediana |
| Optimal | 1,6432 | 1,3103 | 8,4445 | 4,3063 | 7,1772 | 4,5639 | 7,2866 | 4,5104 |
| Warning | 2,8384 | 1,6298 | 6,8550 | 6,7588 | 5,4885 | 4,7217 | 6,0084 | 5,7769 |
| Failure | 1,3999 | 0,9882 | 65,2658 | 9,0114 | 7,7652 | 6,9957 | 15,5323 | 13,7958 |

Tabella 4.12 Media e mediana dei livelli di espressione della proteina di trasporto ABCB1 all'esordio e a diversi time-point dei pazienti che a 12 mesi sono considerati: optimal (BCR-ABL $\leq 0,1\%$), warning (0,1-1%) e failure (BCR-ABL $> 1\%$).

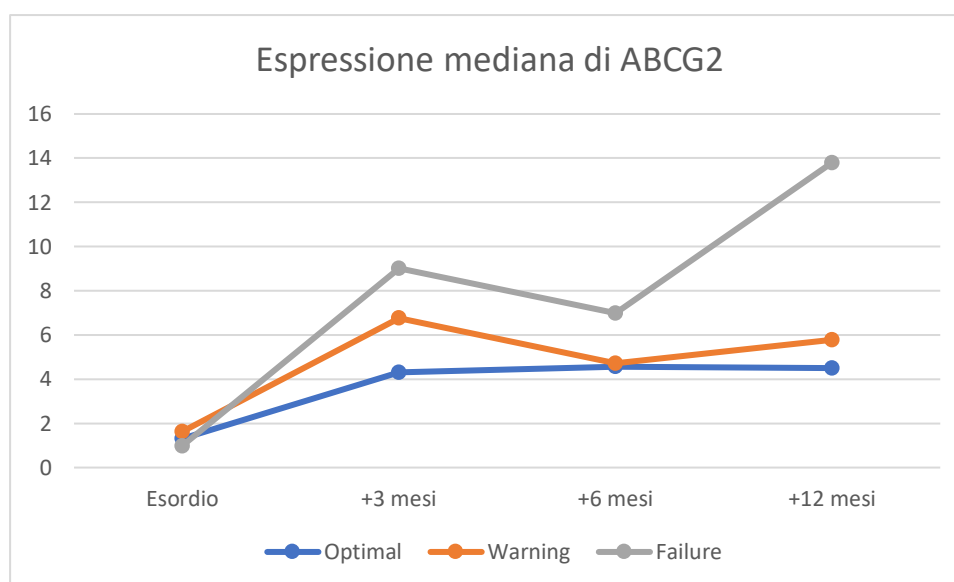


Grafico 4.3 Rappresentazione dei valori mediani dei livelli di espressione della proteina di trasporto ABCG2 dall'esordio ad un anno dall'inizio della terapia in 3 popolazioni: optimal (BCR-ABL $\leq 0,1\%$), warning (0,1-1%) e failure (BCR-ABL $> 1\%$).

Come mostrato nel grafico 4.3, tutti i tre sottogruppi presentano livelli di espressione di ABCG2 simili nei tre *time-point* studiati, tranne a 12 mesi dall'inizio della terapia. A questa valutazione, l'espressione di ABCG2 è aumentata nei pazienti "Failure" rispetto ai casi "Optimal" e "Warning", ma neppure questa differenza risulta significativa ($P = 0,1575$).

4.4 Espressione del gene WT1

4.4.1 Espressione dell'RNA del gene WT1 all'esordio

Il gene WT1 codifica per un fattore di trascrizione che regola i livelli di espressione di una grande varietà di fattori di crescita, differenziazione e trascrizione, ed è quindi profondamente coinvolto nella proliferazione e differenziazione cellulare. Inoltre, aumentati livelli di espressione di WT1 sono stati rilevati in caso di sindromiematologiche maligne, sia acute che croniche, suggerendo il suo ruolo di oncogene. Siamo quindi andati a indagare l'espressione del gene WT1, all'esordio, nei 64 pazienti oggetto di studio, mediante Real-Time PCR (RQ-PCR). I livelli di espressione ottenuti vengono espressi come numero di copie WT1/10000 copie di ABL. I risultati ottenuti sono indicati in tabella 4.13 e mostrano un valore medio di copie di WT1 pari a 308 copie e un valore mediano pari a 129 copie. Tali valori sono sostanzialmente alterati rispetto ad una popolazione sana, dove i valori di espressione di WT1 sul sangue periferico restano al di sotto delle 50copie/10000copie ABL [Cilloni et al., 2009].

| <i>Espressione del gene WT1 all'esordio</i> | |
|--|------------------------|
| Media (\pm dev.std.) | 308 copie (\pm 462) |
| Mediana (range) | 129 copie (4-3116) |

Tabella 4.13 *Espressione del gene WT1 all'esordio nella popolazione oggetto di studio.*

4.4.2 Espressione dell'RNA del gene WT1 all'esordio in relazione alla risposta ai TKIs

Analogamente all'analisi relativa a ABCG2 e ABCB1, abbiamo valutato l'espressione di WT1 all'esordio, suddividendo i pazienti in sottogruppi basati alla risposta ottenuta ai TKIs. Nel dettaglio, la popolazione è stata classificata secondo quanto proposto da *LeukemiaNet*:

| | 3 months | | 6 months | | | 12 months | | |
|-----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|
| | Optimal | Warning | Optimal | Warning | Failure | Optimal | Warning | Failure |
| | <i>BCR-ABL</i> ≤10% | <i>BCR-ABL</i> >10% | <i>BCR-ABL</i> <1% | <i>BCR-ABL</i> 1-10% | <i>BCR-ABL</i> >10% | <i>BCR-ABL</i> ≤0,1% | <i>BCR-ABL</i> 0,1-1% | <i>BCR-ABL</i> >1% |
| WT1 (Media) | 190 copie | 608 copie | 196 copie | 280 copie | 877 copie | 180 copie | 208 copie | 623 copie |

Tabella 4.14 Espressione del gene WT1 all'esordio nella popolazione oggetto di studio suddivisa in base alla risposta ai TKIs.

Sono stati esclusi dalla nostra analisi 3 pazienti a 6 mesi e 5 casi a 12 mesi, in quanto il farmaco scelto in prima linea è stato cambiato a causa di intolleranze o di resistenza al farmaco.

Dalla nostra analisi, emerge che l'espressione di WT1 all'esordio è significativamente maggiore nei pazienti definiti "Warning" a 3 mesi dall'inizio della terapia rispetto ai pazienti "Optimal" ($P = 0,004$), come mostrato in figura 4.1.

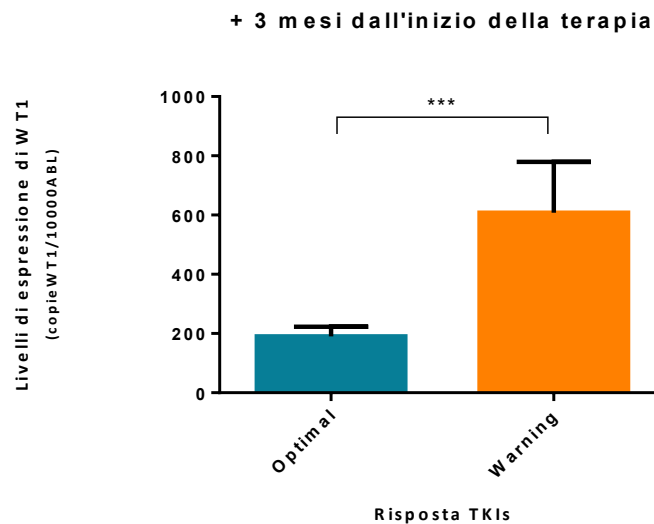


Figura 4.1 Livelli di espressione del gene *WT1* all'esordio in correlazione con la risposta ai TKIs a 3 mesi dall'inizio della terapia. P-value determinato mediante test Mann-Whitney.

Per quanto riguarda la risposta a 6 mesi dall'inizio della terapia, si vede che l'espressione di *WT1* all'esordio è ancora significativamente superiore nei soggetti che rientrano nei "Failure" rispetto ai pazienti "Optimal" ($P = 0,0008$) e ai pazienti "Warning" ($P = 0,0159$) come mostrato in figura 4.2.

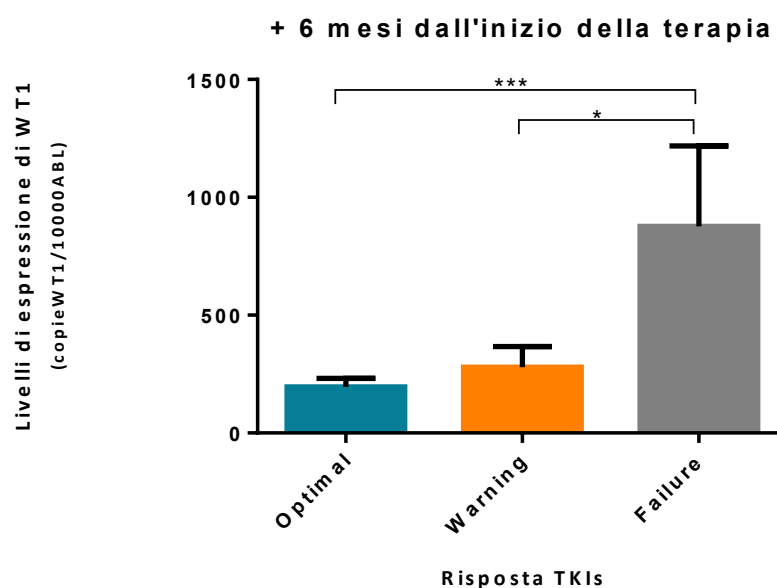


Figura 4.2 Livelli di espressione del gene *WT1* all'esordio in correlazione con la risposta ai TKIs a 6 mesi dall'inizio della terapia. P-value pari a 0,0038 determinato mediante test Kruskal-Wallis.

Infine, relativamente alla casista a 12 mesi dall'inizio della terapia, è emerso che i casi con una risposta "*Optimal*" a confronto con il gruppo "*Failure*" hanno un livello di espressione di WT1 significativamente inferiore ($P = 0,0149$) all'esordio, come mostra la figura 4.3.

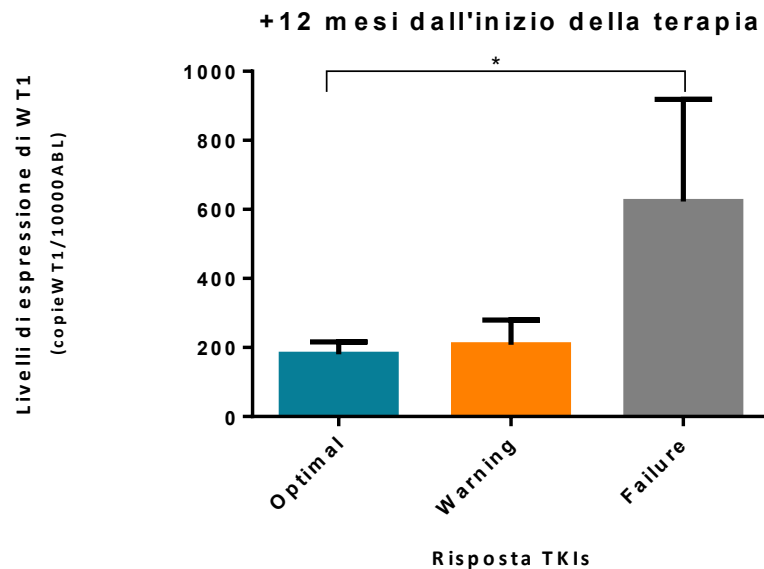


Figura 4.3 Livelli di espressione del gene WT1 all'esordio in correlazione con la risposta agli inibitori tirosin-chinasi a 12 mesi dall'inizio della terapia. P-value determinato mediante test Kruskal-Wallis.

4.4.3 Espressione dell'RNA del gene WT1 all'esordio in relazione alla risposta all'Imatinib

Data la maggior potenza d'azione dei TKI di seconda generazione, si è deciso di suddividere la popolazione oggetto di studio secondo il tipo di inibitore nei rispettivi due gruppi:

- un gruppo di 44 casi trattati in prima linea con Imatinib;
- un gruppo di 20 casi trattati in prima linea con inibitori di seconda generazione.

Sempre in accordo con le raccomandazioni europee LeukemiaNet abbiamo verificato se la significatività tra il livello di espressione di WT1 e la risposta alla terapia, osservati nell'analisi sull'intera popolazione oggetto di studio, permanesse anche all'interno di classi omogenee per tipo di TKI somministrato.

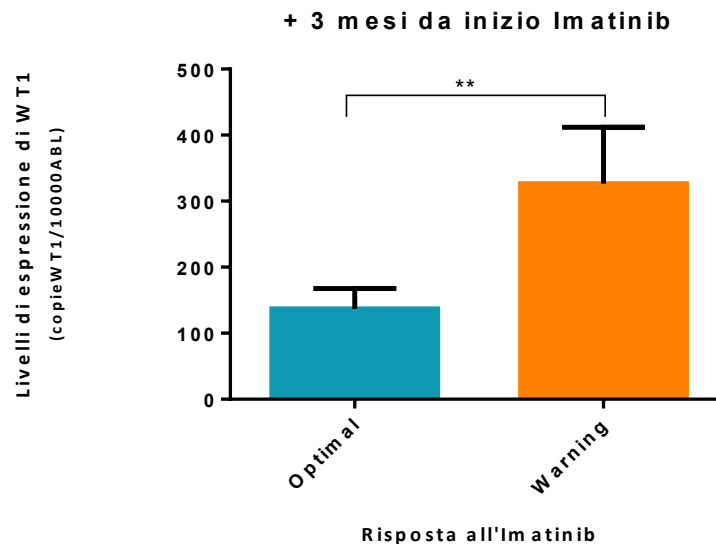


Figura 4.4 Livelli di espressione del gene WT1 all'esordio in correlazione con la risposta all'imatinib a 3 mesi dall'inizio della terapia. P-value determinato mediante test Mann-Whitney.

Come mostra la figura 4.4, i livelli di espressione del gene WT1 all'esordio dei casi considerati "Optimal" a tre mesi dall'inizio della terapia con Imatinib sono significativamente inferiori rispetto ai "Failure" ($P = 0,0023$). Anche nei pazienti "Failure" a 6 mesi dall'inizio di Imatinib rispetto ai pazienti "Optimal" ($P = 0,0064$) e "Warning" ($P = 0,0420$), si associa un valore di WT1 all'esordio significativamente alto, come mostrato in figura 4.5.

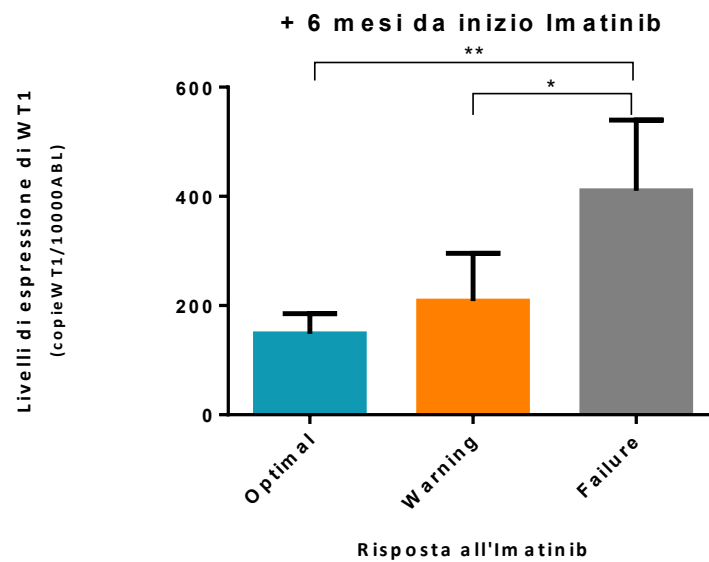


Figura 4.5 Livelli di espressione del gene WT1 all'esordio in correlazione con la risposta all'imatinib a 6 mesi dall'inizio della terapia. P-value pari a 0,0238 determinato mediante test Kruskal-Wallis.

Infine, relativamente alla casistica a 12 mesi dall'inizio della terapia con Imatinib, non è emersa alcuna differenza significativa dei livelli di espressione del trascritto WT1 tra le varie popolazioni (figura 4.6).

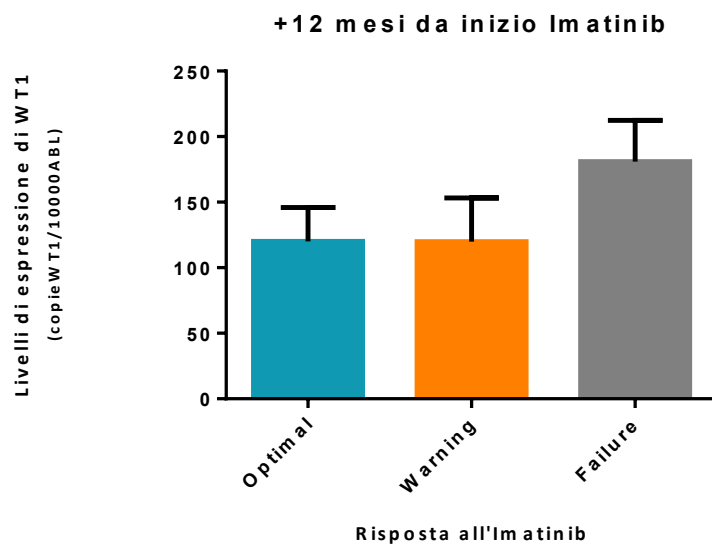


Figura 4.6 Livelli di espressione del gene WT1 all'esordio in correlazione con la risposta all'imatinib a 12 mesi dall'inizio della terapia. P-value pari determinato mediante test Kruskal-Wallis.

4.4.4 Espressione dell'RNA del gene WT1 all'esordio in relazione alla risposta ai 2g-TKIs

I restanti 20 casi, ai quali è stato somministrato in prima linea un inibitore delle tirosin-chinasi di seconda generazione (2g-TKIs), sono stati analizzati secondo la risposta clinica in accordo con le raccomandazioni europee LeukemiaNet per valutare l'associazione con il livello di espressione del trascritto di WT1 all'esordio.

A 3 mesi dall'inizio della terapia con 2g-TKIs, i casi "Warning" mostrano l'associazione con un alto livello di trascritto di WT1 all'esordio rispetto ai casi "Optimal" ($P = 0,0064$) come possiamo vedere dalla figura 4.7.

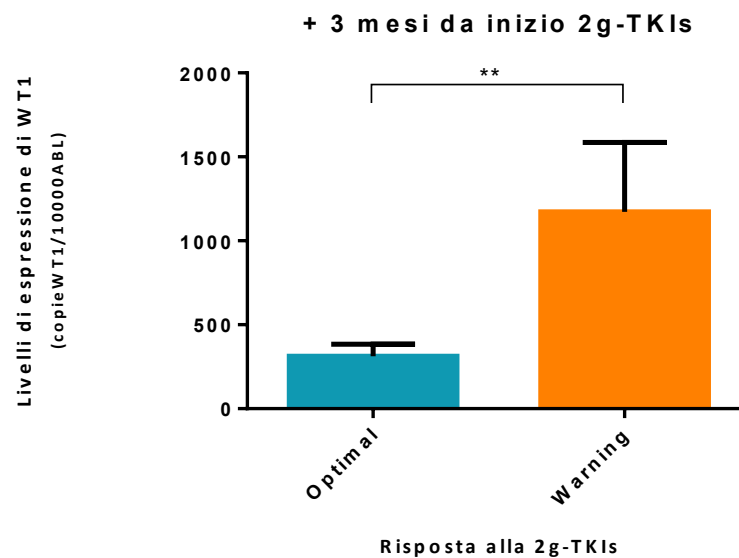


Figura 4.7 Livelli di espressione del gene WT1 all'esordio in correlazione con la risposta a TKIs di 2° generazione a 3 mesi dall'inizio della terapia. P-value determinato mediante test Mann-Whitney.

Anche a 6 mesi dall'inizio della terapia con 2g-TKIs, i pazienti "Failure" presentano un valore significativamente superiore di WT1 all'esordio rispetto ai pazienti "Optimal" ($P = 0,0071$), come mostra la figura 4.8.

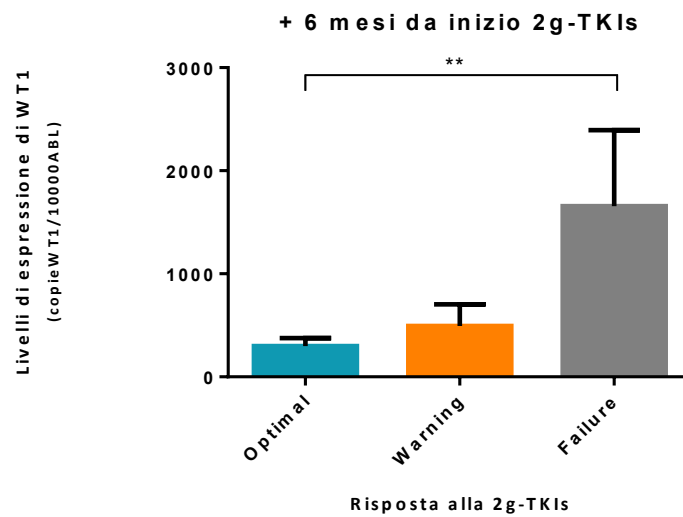


Figura 4.8 Livelli di espressione del gene WT1 all'esordio in correlazione con la risposta a TKIs di 2° generazione a 6 mesi dall'inizio della terapia. P-value pari a 0,0144 determinato mediante test Kruskal-Wallis.

Guardando la figura 4.9 vediamo come, contrariamente da ciò che era emerso nei pazienti trattati in prima linea con Imatinib, il gruppo "Failure" continua a mostrare un livello di trascritto di WT1 all'esordio significativamente superiore rispetto ai casi "Optimal" ($P = 0,0110$) anche a 12 mesi dall'inizio della terapia con i 2g-TKIs.

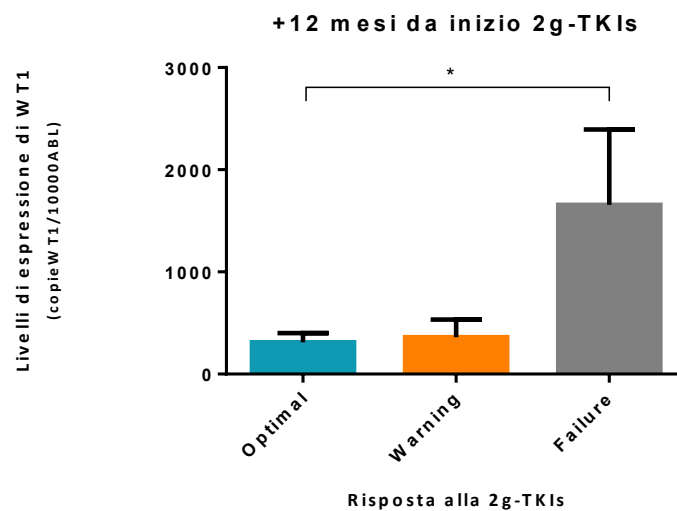


Figura 4.9 Livelli di espressione del gene WT1 all'esordio in correlazione con la risposta a TKIs di 2° generazione a 12 mesi dall'inizio della terapia. P-value pari a 0,0373 determinato mediante test Kruskal-Wallis.

4.5 Studio di associazione con la risposta ai TKIs

Alla luce dell'aumentata espressione di WT1 emersa nel gruppo con risposta non ottimale paragonato con risposta ottimale, abbiamo eseguito un'analisi statistica di associazione univariata nel raggiungimento della risposta ottimale ai TKIs, includendo anche le variabili relative al tipo di TKIs e alla classificazione clinica (ELTS). Per la determinazione del valore soglia di espressione di WT1 è stata effettuata l'analisi di curva ROC. La curva di ROC ha mostrato un'area sotto la curva (AUC) pari a 0,8. Quindi abbiamo definito il *cut-off* ad un valore pari a 630 copie di WT1/10000ABL, che corrisponde alla media dei livelli di espressione di WT1 dei casi "*Optimal*" a 3 mesi + 2 σ (deviazione standard). L'intervallo scelto (>630 copie) presenta specificità uguale al 95% e sensibilità pari al 40%.

A 6 mesi e a 12 mesi, sono stati confrontati i casi "*Optimal*" vs "*Warning+Failure*" in quanto i casi "*Warning*" hanno una risposta subottimale. Per quanto riguarda il valore ELTS, la classe con rischio alto è stata paragonata con la classe di rischio basso+intermedio.

| | 3 mesi | | | | 6 mesi | | | | 12 mesi | | | |
|---|---------------|------------|------------|------|---------------|------------|------------|------|---------|------------|------------|------|
| | P-value | Odds Ratio | I.C. (95%) | | P-value | Odds Ratio | I.C. (95%) | | P-value | Odds Ratio | I.C. (95%) | |
| | | | Min. | Max. | | | Min. | Max. | | | Min. | Max. |
| Espressione WT1 > 630 copie/10 ⁴ ABL | 0,0024 | 14 | 3 | 77 | 0,0092 | 9 | 1,74 | 50 | 0,23 | 2,37 | 0,56 | 9,8 |
| Trattamento con Imatinib | 0,8221 | 1,14 | 0,36 | 3,66 | 0,94 | 1,04 | 0,34 | 3,16 | 0,78 | 0,86 | 0,28 | 2,57 |
| Valore ELTS alto | 0,8959 | 1,18 | 0,09 | 14,4 | 0,877 | 0,82 | 0,07 | 9,91 | 0,877 | 0,82 | 0,07 | 9,91 |

Tabella 4.15 Analisi di associazione univariata mediante regressione logistica della popolazione oggetto di studio.

Come riportato in tabella 4.15, è interessante evidenziare la forte associazione tra un'aumentata espressione di WT1 e la cattiva risposta a 3 e a 6 mesi ($P = 0,0024$ e $P = 0,0092$, rispettivamente). Le altre variabili da noi analizzate in questo tipo di studio non hanno mostrato associazioni significative con la risposta ai TKIs.

Capitolo 5 – DISCUSSIONE e

CONCLUSIONE

L'uso degli inibitori tirosin-chinasi nella leucemia mieloide cronica ha ridotto il significato di caratteristiche che erano state precedentemente identificate come predittori indipendenti di esiti prognostici sfavorevoli, quali: l'età, i punteggi Sokal e Hasford e le delezioni del cromosoma 9 derivato dal riarrangiamento cromosomico. Pur essendo tutt'ora utilizzati, rimane un certo grado di incertezza sul valore di questi classici indicatori prognostici con l'avvento dei TKI in quanto sono stati sviluppati nell'era dell'utilizzo del busulfano e dell'interferone come approcci terapeutici. Con l'Imatinib come standard di cura attuale e con l'aumento delle opzioni di trattamento disponibili, la maggior parte dei pazienti ottiene un controllo duraturo della malattia senza dover andare incontro a chemioterapia tradizionale o al trapianto di cellule staminali allogeniche. La sfida ora sta nello sviluppare un valido e affidabile strumento predittivo che identifichi quei pazienti a rischio di non rispondere bene alla terapia e, cosa più importante, che beneficerebbero di una dose maggiore o di un diverso approccio terapeutico. Questa sfida è ora al centro di molti gruppi di studio, ed è proprio in questo contesto che è stato sviluppato il nostro progetto di ricerca.

La popolazione oggetto del nostro studio è risultata essere in linea con l'epidemiologia della malattia [Jemal et al., 2010; Frazer et al., 2007], infatti nei nostri pazienti l'età media di insorgenza della patologia è di 55 anni e l'incidenza è stata maggiore nel sesso maschile (64%) rispetto a quello femminile. Per quanto riguarda la terapia scelta

in prima linea è stato utilizzato l'Imatinib nella maggior parte dei casi (69%), seguito dagli inibitori di seconda generazione, Nilotinib (22%) e Dasatinib (5%).

La definizione del rischio all'esordio dei nostri pazienti secondo gli indici Sokal, Hasford ed ELTS ha individuato nel gruppo a rischio intermedio quello maggiormente frequente per i primi due indici, mentre nell'indice ELTS, più recente, il gruppo maggiormente rappresentato è quello a basso rischio. Il gruppo a rischio intermedio rappresenta una "zona grigia" nella quale non è possibile predire con sicurezza il tipo di risposta alla terapia. In linea con queste evidenze, nel nostro studio, non sono emerse associazioni significative tra la classificazione prognostica clinica e la risposta ai TKIs. Infatti, dalla letteratura, l'utilità di questi tre punteggi di rischio nella stratificazione della LMC è oggetto di discussione [Ganta et al., 2017], anche per il fatto che non viene tenuto in considerazione alcun marcatore molecolare. In quest'ambito, abbiamo successivamente indagato il tipo di trascritto, l'espressione del trascritto delle proteine di resistenza ABCB1 e ABCG2 e del gene marcatore pan-leucemico WT-1.

In merito al tipo di trascritto di fusione dell'oncogene BCR-ABL, nella nostra casistica il trascritto b3a2 ha mostrato un'incidenza del 56%, per il b2a2 del 39% e dell'8% per entrambi i trascritti, analogamente alle incidenze riportate da altri studi [Sharma et al., 2010]. Il differente tipo di trascritto è stato già analizzato in relazione alla risposta al trattamento, con risultati contrastanti. In uno studio su 26 pazienti, de Lemos et al. ha riportato a 6 mesi in pazienti con LMC una significativa riduzione dell'espressione di BCR-ABL associata ad un trascritto b2a2 rispetto al trascritto di b3a2 ($P < .0002$), in linea con quanto già riportato da Lomaia et al. (2006). Tuttavia, Vega Ruiz et al. (2007) ha riportato correlazioni tra migliori risposte e tipo di trascritto b3a2. Più

recentemente, Castagnetti et al. (2017), ha proposto che il trascritto di fusione b2a2 possa influenzare la profondità e la velocità della risposta al trattamento con Imatinib in prima linea e che, lo studio del tipo di trascritto nel calcolo dei punteggi del rischio di base, possa migliorare la stratificazione prognostica e la scelta della strategia terapeutica. Nella nostra indagine, il tipo di trascritto non ha mostrato un'associazione significativa sulla risposta ai TKIs. Tuttavia è stato interessante osservare che i casi che presentano entrambi i tipi di trascritto hanno sempre mostrato una risposta ottimale ai TKIs nonostante la bassa numerosità del campione analizzato.

Nella LMC, i TKIs vengono somministrati a dosi fisse, senza considerare le caratteristiche fisiche del paziente o del metabolismo del farmaco, e poco o nulla si sa in merito alle proteine di resistenza. Tali proteine giocano un ruolo fondamentale nel caso delle cellule neoplastiche, in quanto rappresentano il meccanismo di estrusione dei chemioterapici e possono giocare un ruolo importante nella resistenza ai farmaci, come dimostrato da numerosi studi in campo oncoematologico ed in particolare nelle Leucemie Mieloidi Acute [Damiani et al., 2006], in cui la loro aumentata espressione in membrana correla con una prognosi sfavorevole.

Nel campo della Leucemia Mieloide Cronica, le proteine ABC sono state meno studiate, in quanto questa è una patologia di cui si conosce la lesione molecolare patogenetica e per cui esiste una terapia molecolare mirata. Nonostante gli eccellenti risultati ottenuti da queste terapie, in una significativa quota di pazienti il trattamento fallisce. Sempre maggiori dati indicano che i pazienti più predisposti a sviluppare tale complicanza, sono quelli che hanno raggiunto la risposta molecolare in più lunghi. Al momento non è chiaro né come mai alcuni pazienti raggiungano tale tipo di risposta

con tempistiche differenti a parità di farmaco inibitore, né come individuare i pazienti che potrebbero giovare di un inibitore delle tirosin-chinasi di seconda generazione già in prima linea per ottenere una risposta in un tempo inferiore.

Una tipologia di resistenza alle terapie BCR-ABL-indipendente è la resistenza multifarmaco che è mediata dall'attivazione di diversi meccanismi di detossificazione, come l'aumento di espressione e di funzionalità delle pompe di efflusso ATPdipendenti. Infatti, è stato recentemente dimostrato come le cellule staminali di LMC (CD34 e Ph positive) siano insensibili all'Imatinib [Graham et al., 2002] e come, molto probabilmente, il meccanismo implicato in questa resistenza sia l'efflusso dei farmaci mediato da proteine trasportatrici di membrana [Jiang et al., 2007]. Contemporaneamente, diversi studi hanno documentato come l'Imatinib e il Nilotinib siano substrati rispettivamente della proteina di trasporto ABCG2 e ABCB1 [Burger et al., 2004; Villar et al., 2012]. Diversi studi hanno cercato di trovare una correlazione tra la riduzione della risposta alla terapia e la presenza di una aumentata espressione del trascritto delle proteine di resistenza ABCB1 e ABCG2 [Terezina de Lima et al., 2014; Eadie et al., 2017; Burger et al., 2004]. In tale ambito gli studi eseguiti fino ad ora hanno dato risultati contrastanti.

In questa tesi è stata analizzata la possibile correlazione tra l'espressione dell'RNA dei geni ABCB1 e ABCG2 e la risposta alla terapia, in un pool di pazienti seguiti presso la Clinica Ematologica di Udine, al fine di poter individuare un test predittivo rapido di resistenza al farmaco. Innanzitutto abbiamo studiato quale fosse l'espressione dei trascritti ABCB1 e ABCG2 nell'intera popolazione di studio e come si comportasse la loro espressione durante i primi mesi di somministrazione della terapia, quando si va a

definire la prognosi del malato di LMC. La proteina ABCB1 all'esordio ha dimostrato un'espressione media di 0,1845, valore che aumenta progressivamente di un ordine di grandezza (livello medio pari a 1,0747 a 12 mesi dall'inizio della terapia); per quanto riguarda ABCG2, invece, è stato evidenziato all'esordio un valore medio pari a 1,891 che aumentata nel tempo. È stato interessante notare come l'espressione di ABCG2 aumenti in maniera più spiccata dopo tre mesi dall'inizio della terapia raggiungendo un valore medio di 16,4079 per poi decrescere intorno a un livello di 8, a 6 e 12 mesi. Questi dati sono in accordo con quanto già visto da Dohse et al. nel 2010 e da Eadie et al. nel 2017, dove è stato evidenziato che l'Imatinib, il Dasatinib e il Nilotinib sono substrato delle proteine di trasporto ABC e che stimolano l'espressione di tali trasportatori. Sarà interessante indagare se il maggior incremento di espressione di ABCG2 visibile a 3 mesi possa essere dovuto alla maggior quota di cellule BCR-ABL positive presenti a questo *time-point* rispetto a quelli successivi, dove l'effetto dei farmaci ha già portato a un sostanziale decremento dell'effettiva massa tumorale. Per poter valutare se la differente espressione di tali proteine potesse impattare sulla mancata o tardiva risposta di alcuni pazienti, abbiamo poi eseguito un'analisi di espressione dell'RNA delle proteine ABCB1 e ABCG2 in correlazione alla risposta ai TKIs proposta dalle raccomandazioni Europee LeukemiaNet. Questa indagine non ha evidenziato correlazioni significative relativamente all'espressione di ABCB1, mentre l'espressione di ABCG2 pare essere significativamente più alta nei pazienti con buona risposta a 3 mesi. Tale significatività non viene mantenuta nelle risposte a 12 mesi, probabilmente a causa della bassa numerosità campionaria. In generale questi dati sono in linea con quanto recentemente riportato da Rinaldetti et al. dove è stato

mostrato che elevati livelli di ABCG2, rilevati l'ultimo giorno prima dell'interruzione del farmaco, associano con un maggiore rischio di recidiva.

Infine abbiamo valutato l'espressione del marcatore panleucemico WT1, che codifica per un fattore di trascrizione zinc-finger ed è stato descritto per la prima volta come gene oncosoppressore nel tumore pediatrico del rene, il tumore di Wilms. Nei tessuti normali, WT1 è un importante regolatore della crescita e dello sviluppo delle cellule [Wagner et al. 2014; Wang et al, 2014]. Tuttavia, il suo ruolo nel cancro non è ancora stato ben definito poiché presenta caratteristiche funzionali contrastanti tra un ruolo soppressivo o oncogenico [Li et al., 2014; Iiyama et al., 2007].

Nel nostro studio abbiamo analizzato i livelli di trascritto del gene WT1 nella frazione di cellule nucleate selezionate da campioni di sangue periferico, in modo da poter disporre di un test poco invasivo e pressoché contemporaneo alla rilevazione molecolare del BCR-ABL. Una prima osservazione dei dati ha mostrato una media di 308 copie di WT1/10000ABL con una variabilità molto ampia che va da 4 a 3116 copie. La gran parte dei pazienti della nostra casistica (50 casi su 64 pari al 78%) ha mostrato valori di WT1 nel sangue periferico superiori alla popolazione sana di riferimento (>50copie/10000ABL, pubblicato da Cilloni et al. nel 2009). In questo modo il nostro studio ha fornito un'ulteriore evidenza dell'aumento dell'espressione di WT1 in pazienti con LMC. Inoltre, tra le malattie ematologiche maligne, WT1 si è dimostrato un valido marcatore di malattia minima residua nella leucemia acuta mieloide, correlando strettamente con la presenza dei blasti leucemici. Tale corrispondenza, nella LMC, invece, non è stata dimostrata e non ha mai ricoperto un alto valore predittivo, da momento che ci si può basare sul marcatore BCR-ABL, altamente

specifico per la malattia. Ciononostante, la correlazione tra i livelli di WT1 e quelli di BCR-ABL sono ancora poco chiari, con evidenze che mostrano sia alta che bassa associazione tra i due marcatori [Cilloni et al., 2003; Schnittger et al., 2009; Uzunel et al., 2004]. Secondo Kreuzer et al., però, la valutazione mediante RQ-PCR del trascritto WT1 potrebbe fornire un vantaggio nel monitoraggio a lungo termine dei pazienti affetti da LMC in risposta molecolare [Kreuzer et al., 2001]. Dal punto di vista biologico, Cilloni e colleghi hanno dimostrato, inoltre, un diretto rapporto tra l'attivazione di BCR-ABL e WT1, poiché hanno osservato che l'inibizione della tirosin-chinasi BCR-ABL diminuisce l'espressione di WT1 nelle linee cellulari Philadelphia positive e nei campioni di midollo osseo di pazienti con LMC [Cilloni et al., 2004]. Successivamente, questo dato è stato ulteriormente confermato da Svensson et al. (2007) che ha mostrato come la via del fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) e Akt porti all'espressione di maggiori livelli cellulari di mRNA e proteina WT1 nelle linee cellulari di LMC. I meccanismi di regolazione dell'espressione di WT1, così come le sue conseguenze, rimangono ancora poco chiari, ma già altri hanno provato a indagare il suo potenziale significato prognostico.

Cilloni et al. ha indagato il valore di espressione di WT1 nel sangue midollare di 36 pazienti affetti da LMC all'esordio in vivo e in vitro e ha scoperto che una breve incubazione con Imatinib riduce l'aumentato livello di WT1 solo nei pazienti che sono stati successivamente definiti buoni responder a Imatinib, ma non in quei pazienti che hanno dimostrato una risposta subottimale. In seguito, Otahalova e colleghi hanno riportato che la reattività dei pazienti con LMC alla terapia con Imatinib potrebbe essere prevista dall'analisi di espressione del gene WT1 semiquantitativa nei leucociti

del sangue periferico, consentendo ai medici di predire in modo meno invasivo la risposta di questi pazienti, seppur questo test debba essere ancora messo a punto [Otahalova et al., 2009].

Più recentemente, Zhang et al. ha dimostrato che il pattern di espressione del gene di fusione BCR-ABL p210 è coerente con quello di WT1 e che quest'ultimo svolge un ruolo importante nella progressione della LMC e nella resistenza ai TKIs in quanto la modulazione di una proteina regolatrice (HtrA2) a monte di WT1 influenza l'apoptosi delle cellule BCR-ABL p210 positive [Zhang et al. nel 2017].

Alla luce di questo dato abbiamo poi effettuato un'analisi più attenta dividendo la popolazione secondo i criteri di risposta forniti dalle raccomandazioni europee LeukemiaNet in base al livello di trascritto BCR-ABL rilevabile a 3, 6 e 12 mesi dall'inizio della terapia con TKIs. Così abbiamo potuto osservare che l'espressione di WT1 su sangue periferico all'esordio risultava significativamente superiore nei pazienti *"Warning"* a 3 mesi, e *"Failure"* a 6 e 12 mesi rispetto agli *"Optimal responders"*. Per evitare il fattore confondente del tipo di terapia, abbiamo suddiviso la casistica secondo il tipo di TKIs somministrato in prima linea. Anche in questo caso, i livelli di WT1 all'esordio erano significativamente superiori nel gruppo *"Warning"* e *"Failure"* a 3 e 6 mesi in caso di terapia con Imatinib, mentre l'associazione non è risultata significativa rispetto alle risposte tardive, a causa della perdita di numerosità campionaria dovuta alla necessità clinica di passare a un TKI di seconda generazione. È stato interessante notare che anche nel sottogruppo dei pazienti trattati in prima linea con TKIs di seconda generazione, i livelli di WT1 all'esordio si sono dimostrati più elevati nei casi con risposta *"Warning"* e *"Failure"*, mantenendo la significatività

statistica anche a 12 mesi, oltre che nelle risposte precoci (3 e 6 mesi). Siamo poi riusciti a identificare un possibile valore soglia di WT1 che potesse identificare i pazienti a maggior rischio di non rispondere in maniera ottimale e lo abbiamo testato come marcatore prognostico rispetto anche alle altre variabili più rilevanti o di maggior uso clinico. Da questa analisi è emerso che un livello di WT1 superiore a 630copie/10000ABL all'esordio correla con un alto rischio di risposta "*Failure*" a 3 e a 6 mesi, identificando pertanto un sottogruppo di pazienti ad alto rischio, che vanno attentamente monitorati dal punto di vista biologico e molecolare, alla ricerca di un potenziale rischio di sviluppare resistenza ai TKIs sia di prima che di seconda generazione. Nell'analisi di rischio, l'espressione di WT1 all'esordio è risultata l'unica variabile significativa, con *P* pari a 0,0024 e 0,0092 rispettivamente a 3 e 6 mesi.

Infine, abbiamo voluto includere nello studio dei possibili fattori di rischio di scarsa risposta anche la classificazione clinica ELTS, poiché facilmente e largamente utilizzata dai clinici, e la scelta del tipo di inibitorie di BCR-ABL. Tale recente classificazione prognostica non ha saputo identificare il gruppo di pazienti a peggior risposta ai TKIs, seppur includa dati clinici rilevanti e il numero di cellule blastiche presenti all'esordio. Anche la scelta di avviare il paziente in prima linea a TKI di prima o seconda generazione, non ha dimostrato correlazione con una reale probabilità di miglior risposta. Quest'ultimo dato potrebbe suggerire che la disregolazione dell'espressione di WT1, quando probabilmente supera un certo livello, porti all'incapacità di rispondere in maniera completa all'inibizione operata dai TKIs sulla tirosin-chinasi BCR-ABL, seppur impiegando inibitori più potenti. Tale aspetto rimane tutt'ora molto complesso e sotto indagine.

L'evidenza portata dalle nostre analisi suggerisce che i livelli di WT1 alla diagnosi possono rappresentare un marker prognostico per i pazienti con LMC, sebbene il valore di questo marker debba essere confermato in una serie di pazienti più ampia e più uniforme.

Concludendo possiamo affermare che con l'aumento delle opzioni di trattamento disponibili per i pazienti con LMC, c'è una grande necessità insoddisfatta nel raffinare le metriche del punteggio di rischio prognostico che possono aiutare nelle decisioni terapeutiche. La metrica ideale del punteggio di rischio dovrebbe discriminare chiaramente i gruppi a rischio con elevata sensibilità e specificità. Dovrebbe essere facile da applicare e ampiamente accettabile. Il sistema di valutazione del rischio accettato universalmente facilita il confronto diretto tra le prove e nell'elaborazione di linee guida conclusive. Nello scenario ideale, un pannello di screening di test alla diagnosi fornirà un'indicazione della TKI più efficace per ogni singolo paziente, insieme alla dose più efficace. Dall'introduzione dei TKIs, sono stati fatti progressi significativi nello sviluppo di marcatori prognostici nella LMC. Si prevede che quest'area di ricerca continuerà a crescere rapidamente e che un risultato significativo per i pazienti con una risposta subottimale potrebbe essere realizzato in futuro attraverso l'uso di buoni indicatori prognostici.

BIBLIOGRAFIA

Advani A.S., Pendergast A.M. - *Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects* - Leukemia Research 2002; 26:713-720.

Armstrong J.F., Pritchard-Jones K., Bickmore W.A., Hastie N.D., Bard J.B. - *The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo* - Mech Dev. 1993 Jan;40(1-2):85-97.

Baccarani M., Cortes J., Pane F., Niederwieser D., Saglio G., Apperley J., Cervantes F., Deininger M., Gratwohl A., Guilhot F., Hochhaus A., Horowitz M., Hughes T., Kantarjian H., Larson R., Radich J., Simonsson B., Silver R.T., Goldman J., Hehlmann R. - *Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet* - J Clin Oncol. 2009; 27:6041-51.

Baccarani M., Pane F., Saglio G. - *Monitoring treatment of chronic myeloid leukemia*. - Haematologica 2008; 93:161-166.

Baccarani M., Rosti G., de Vivo A., Bonifazi F., Russo D., Martinelli G., Testoni N., Amabile M., Fiacchini M., Montefusco E., Saglio G., Tura S; Italian Cooperative Study Group on Myeloid Leukemia. - *A randomized study of interferon-alpha versus interferon-alpha and low-dose arabinosyl cytosine in chronic myeloid leukemia* - Blood. 2002; 99:1527-35.

Baccarani M., Saglio G., Goldman J., Hochhaus A., Simonsson B., Appelbaum F., Apperley J., Cervantes F., Cortes J., Deininger M., Gratwohl A., Guilhot F., Horowitz M., Hughes T., Kantarjian H., Larson R., Niederwieser D., Silver R., Hehlmann R.; European LeukemiaNet. - *Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet*. - Blood. 2006; 108:1809-20.

Baccarani M., Deininger M.W., Rosti G. et al. - *European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013* - Blood; 2013; 122(6): 872-84.

Baird P.N., Simmons P.J. - *Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hemopoiesis* - Exp Hematol. 1997 Apr;25(4):312-20.

Barch M. J., Knutsen T., Spurbeck J.L., - *The AGT cytogenetics laboratory manual* - Lippincott-Raven Ed. 1997.

Beillard E., Pallisgaard N., van der Velden V.H., Bi W., Dee R., van der Schoot E., Delabesse E., Macintyre E., Gottardi E., Saglio G., Watzinger F., Lion T., van Dongen J.J., Hokland P., Gabert J. - *Evaluation of candidate control genes for diagnosis and*

residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reversetranscriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe Against Cancer Program. - Leukemia 2003; 17:2474-86.

Bergmann L, Miething C, Maurer U, Brieger J, Karakas T, Weidmann E, Hoelzer D. - *High levels of Wilms' tumor gene (WT1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome* - Blood. 1997 Aug 1;90(3):1217-25.

Brieger J, Weidmann E, Fenchel K, Mitrou PS, Hoelzer D, Bergmann L. - *The expression of the Wilms' tumor gene in acute myelocytic leukemias as a possible marker for leukemic blast cells* - Leukemia. 1994 Dec;8(12):2138-43.

Bosi A., De Stefano V., La Nasa G. & Di Raimondo F. - *Manuale di malattie del sangue* - Milano: Elsevier 2012.

Burger, H. & Nooter, K. - *Pharmacokinetic Resistance to Imatinib Mesylate - Role of the ABC Drug Pumps ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) in the Oral Bioavailability of Imatinib* - Cell Cycle 2004; 3(12):1502-1505.

Burger, H. et al. - *Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump* - Blood 2004; 104(9):2940-2942.

Castagnetti F., Gugliotta G., Breccia M., Iurlo A., Levato L., Albano F., Vigneri P., Abruzzese E., Rossi G., Rupoli S., Cavazzini F., Martino B., Orlandi E., Pregno P., Annunziata M., Usala E., Tiribelli M., Sica S., Bonifacio M., Fava C., Gherlinzoni F., Bocchia M., Soverini S., Bochicchio M.T., Cavo M., Giovanni M., Saglio G., Pane F., Baccarani M., Rosti G. GIMEMA CML Working Party - *The BCR-ABL1 transcript type influences response and outcome in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients treated frontline with imatinib* - Am J Hematol. 2017 Aug;92(8):797-805.

Castoldi G. & Liso V. - *Malattie del sangue e degli organi ematopoietici* - McGraw-Hill Ed. 2004.

Chen Y., Peng C., Li D., Li S. - *Molecular and cellular bases of chronic myeloid leukaemia* - Protein Cell. 2010; 1:124-32.

Chen, K. G. & Sikic, B. I. - *Molecular Pathways: Regulation and Therapeutic Implications of Multidrug Resistance* - Clinical Cancer Research 2012; 18(7):1863-1869.

Cilloni D, Gottardi E, Messa F, Fava M, Scaravaglio P, Bertini M, Girotto M, Marinone C, Ferrero D, Gallamini A, Levis A, Saglio G; Piedmont Study Group on Myelodysplastic Syndromes - *Significant correlation between the degree of WT1*

expression and the International Prognostic Scoring System Score in patients with myelodysplastic syndromes - J Clin Oncol. 2003 May 15;21(10):1988-95.

Cilloni D, Messa F, Gottardi E, et al. - *Sensitivity to imatinib therapy may be predicted by testing Wilms tumor gene expression and colony growth after a short in vitro incubation* - Cancer 2004;101:979–988.

Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic JV, Gottardi E, Fava M, Schnittger S, Weiss T, Izzo B, Nomdedeu J, van der Heijden A, van der Reijden BA, Jansen JH, van der Velden VH, Ommen H, Preudhomme C, Saglio G, Grimwade D - *Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study* - J Clin Oncol. 2009; 27(31):5195-201.

Cortes J. - *Natural history and staging of chronic myelogenous leukaemia* - Hematol. Oncol. Clin. North Am. 2004; 18:569-584.

Cortes J., O'Dwyer M.E. - *Clonal evolution in chronic myelogenous leukemia* - Hematol. Oncol. Clin. N. Am. 2004; 18:671-684.

Cortes J., Quintás-Cardama A., Kantarjian H.M. - *Monitoring molecular response in chronic myeloid leukemia* - Cancer. 2011; 117:1113-22.

Cortes J.E., Talpaz M., Kantarjian H. - *Chronic myeloid leukaemia: a review* - Am J Med. 1996; 100:555-70.

Crawley C., Szydlo R., Lalancette M., Bacigalupo A., Lange A., Brune M., Juliusson G., Nagler A., Gratwohl A., Passweg J., Komarnicki M., Vitek A., Mayer J., Zander A., Sierra J., Rambaldi A., Ringden O., Niederwieser D., Apperley JF; Chronic Leukemia Working Party of the EBMT. - *Outcomes of reduced-intensity transplantation for chronic myeloid leukemia: an analysis of prognostic factors from the Chronic Leukemia Working Party of the EBMT* - Blood. 2005; 106: 2969-2976.

Cross N.C. - *Standardisation of molecular monitoring for chronic myeloid leukaemia* - Best Pract Res Clin Haematol. 2009; 22:355-65.

Cross N.C., White H.E., Colomer D., Ehrencrona H., Foroni L., Gottardi E., Lange T., Lion T., Machova Polakova K., Dulucq S., Martinelli G., Oppliger Leibundgut E., Pallisgaard N., Barbany G., Sacha T., Talmaci R., Izzo B., Saglio G., Pane F., Müller M.C., Hochhaus A. - *Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia* - Leukemia. 2015 May;29(5):999-1003.

Damiani, D. et al. - *The prognostic value of P-glycoprotein (ABCB) and breast cancer resistance protein (ABCG2) in adults with de novo acute myeloid leukemia with normal karyotype* - Haematologica 2006; 91:825-828.

Dean, M., Fojo, T. & Bates, S. - *Tumor Stem Cells and Drug Resistance* - Cancer 2005; 5:275-284.

Dean, M., Rzhetsky, A. & Allikmets, R., 2001 - *The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily* - Genome Research 2001; 11(7):1156-1166.

Deininger M.W., Goldman J.M., Melo J.V. - *The molecular biology of chronic myeloid leukaemia*. - Blood. 2000; 96:3343-56.

De Lavallade H., Apperley J.F., Khorashad J.S., Milojkovic D., Reid A.G., Bua M., Szydlo R., Olavarria E., Kaeda J., Goldman J.M., Marin D. - *Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: incidence of sustained responses in an intention-to-treat analysis* - J Clin Oncol. 2008; 26:3358-63.

Dohse M., Scharenberg C., Shukla S., Robey R.W., Volkmann T., Deeken J.F., Brendel C., Ambudkar S.V., Neubauer A., Bates S.E. - *Comparison of ATP-Binding Cassette Transporter Interactions with the Tyrosine Kinase Inhibitors Imatinib, Nilotinib, and Dasatinib* - Drug Metab Dispos Biol Fate Chem 2010; 38:1371-80.

Druker B.J., Sawyers C.L., Kantarjian H., Resta D.J., Reese S.F., Ford J.M., Capdeville R., Talpaz M. - *Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukaemia and acute lymphoblastic leukaemia with the Philadelphia chromosome*. - N Engl J Med. 2001; 344:1038-42.

Eadie, L. N. et al. - *The clinical significance of ABCB1 overexpression in predicting outcome of CML patients undergoing first-line imatinib treatment* - Leukemia 2017 Jan;31(1):75-82.

Faderl S., Talpaz M., Estrov Z., O'Brien S., Kurzrock R., Kantarjian H.M. - *The biology of chronic myeloid leukaemia* - N Engl J Med. 1999; 341:164-72.

Fetsch, P. A. et al. - *Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance associated protein in normal tissues* - Cancer Letters 2006; 235:84-92.

Fialkow P.J., Martin P.J., Najfeld V., Penfold G.K., Jacobson R.J., Hansen J.A. - *Evidence for a multistep pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia* - Blood 1981; 58:150-63.

Frazer R., Irvine A.E., McMullin M.F. - *Chronic Myeloid Leukaemia in the 21st century* - Ulster Med J 2007; 76:8-17.

Gabert J., Beillard E., van der Velden V.H., Bi W., Grimwade D., Pallisgaard N., Barbany G., Cazzaniga G., Cayuela J.M., Cavé H., Pane F., Aerts J.L., De Micheli D., Thirion X., Pradel V., González M., Viehmann S., Malec M., Saglio G., van Dongen J.J. - *Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program.* - *Leukemia* 2003; 17:2318-57.

Ganta R.R., Nasaka S., Linga V.G., Gundeti S., Maddali L.S., Digumarti R.R. - *Effectiveness of Three Prognostic Scoring Systems in Predicting the Response and Outcome in Pediatric Chronic Myeloid Leukemia Chronic Phase on Frontline Imatinib* - *Indian J Med Paediatr Oncol.* 2017 Jul-Sep;38(3):282-286.

Goldman J.M. - *Chronic myeloid leukemia: a historical perspective* - *Semin Hematol.* 2010; 47:302-11.

Goldman J.M. and Melo J.V. - *Chronic myeloid leukaemia-advances in biology and new approaches to treatment* - *N. Engl. J. Med.* 2003; 349: 1451-64

Gorre M.E., Mansoor M., Ellwood K., Hsu N., Paquette R., Rao P.N., Sawyers C.L. - *Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification* - *Science* 2001; 293:876-880.

Gottesman, M. M., Fojo, T. & Bates, S. E. - *Multidrug Resistance in Cancer: Role of ATP-Dependent Transporters* - *Nature Reviews Cancer* 2002;2(1), pp. 48-58.

Graham, S. M. et al. - *Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro* - *Blood* 2002; 99(1):319-325.

Gratwohl A., Hermans J., Goldman J.M., Arcese W., Carreras E., Devergie A., Frassonni F., Gahrton G., Kolb H.J., Niederwieser D., Ruutu T., Vernant J.P., de Witte T., Apperley J. - *Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation.* - *Lancet.* 1998; 352:1087-1092.

Guilhot F., Chastang C., Michallet M., Guerci A., Harousseau J.L., Maloisel F., Bouabdallah R., Guyotat D., Cheron N., Nicolini F., Abgrall J.F., Tanzer J. - *Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group* - *N Engl J Med.* 1997; 337:223-9.

Hedgedus, C. et al. - *Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: implications for altered anti-cancer effects and 113 pharmacological properties* - *British Pharmacological Society* 2009; 158:1153-1164.

Hehlmann R., Hochhaus A., Baccarani M. - *Chronic myeloid leukaemia* - Lancet 2007; 370:342-50.

Hochhaus A., Baccarani M., Deininger M., Apperley J.F., Lipton J.H., Goldberg S.L., Corm S., Shah N.P., Cervantes F., Silver R.T., Niederwieser D., Stone R.M., Dombret H., Larson R.A., Roy L., Hughes T., Müller M.C., Ezzeddine R., Countouriotis A.M., Kantarjian H.M. - *Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib* - Leukemia. 2008; 22:1200-6.

Hochhaus A., Müller M.C., Radich J., Branford S., Kantarjian H.M., Hanfstein B., Rousselot P., Kim D.W., Lipton J.H., Bleickardt E., Lambert A., Hughes T.P. - *Dasatinib-associated major molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase following imatinib failure: response dynamics and predictive value* - Leukemia. 2009; 23:1628-33.

Hochhaus A., Weisser A., La Rosée P., Emig M., Müller M.C., Saussele S., Reiter A., Kuhn C., Berger U., Hehlmann R., Cross N.C. - *Detection and quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia* - Leukemia. 2000; 14:998-1005.

Hochhaus A. - *Chronic myelogenous leukemia (CML): resistance to tyrosine kinase inhibitors* - Ann Oncol. 2006 Sep;17 Suppl 10:x274-9.

Hochhaus, A. et al. - *Frontline nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: results from the European ENEST1st study* - Leukemia 2016; 30:57-64.

Hosen N, Sonoda Y, Oji Y, Kimura T, Minamiguchi H, Tamaki H, Kawakami M, Asada M, Kanato K, Motomura M, Murakami M, Fujioka T, Masuda T, Kim EH, Tsuboi A, Oka Y, Soma T, Ogawa H, Sugiyama H. - *Very low frequencies of human normal CD34+ haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cells* - Br J Haematol. 2002 Feb;116(2):409-20.

Iacobucci I., Saglio G., Rosti G., Testoni N., Pane F., Amabile M., Poerio A., Soverini S., Bassi S., Cilloni D., Bassan R., Breccia M., Lauria F., Izzo B., Merante S., Frassonni F., Paolini S., Montefusco E., Baccarani M., Martinelli G.; GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. - *GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. Achieving a major molecular response at the time of a complete cytogenetic response (CCgR) predicts a better duration of CCgR in imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients.* - Clin Cancer Res 2006; 12:3037-42.

Iiyama T, Udaka K, Takeda S, Takeuchi T, Adachi YC, Ohtsuki Y, et al. - *WT1 (Wilms' tumor 1) peptide immunotherapy for renal cell carcinoma* - Microbiol Immunol. 2007;51(5):519-30.

Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Nakagawa M, Yamagami T, Miwa H, Kita K, Hiraoka A,

Masaoka T, Nasu K - *WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukaemia* - Blood. (1994) 84(9):3071-9.

Jabbour E., Cortes J.E., Kantarjian H.M. - *Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia: response to tyrosine kinase inhibitors and prognostic implications* - Cancer. 2008; 112:2112-8.

Jabbour, E. J. & Kantarjian, H. - *CME Information: Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management* - American Journal of Hematology 2014; 89(5):547-556.

Jabbour, E. & Kantarjian, H. - *CME Information: Chronic Myeloid Leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy and monitoring* - American Journal of Hematology 2016; 91(2):252-265.

Jemal A., Siegel R., Xu J. et al. - *Cancer statistics, 2010* - Cancer Journal for Clinicians; 2010; 60(5): 277-300.

Jiang ZP, Zhao XL, Takahashi N, et al. - *Trough concentration and ABCG2 polymorphism are better to predict imatinib response in chronic myeloid leukemia: a meta-analysis* - Pharmacogenomics 2017; 18:35-56.

Jones, P. & George, A. - *The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research* - Cellular and Molecular Life Sciences 2004; 61:682-699.

Kantarjian H., Sawyers C., Hochhaus A., Guilhot F., Schiffer C., Gambacorti-Passerini C., Niederwieser D., Resta D., Capdeville R., Zoellner U., Talpaz M., Druker B., Goldman J., O'Brien S.G., Russell N., Fischer T., Ottmann O., Cony-Makhoul P., Facon T., Stone R., Miller C., Tallman M., Brown R., Schuster M., Loughran T., Gratwohl A., Mandelli F., Saglio G., Lazzarino M., Russo D., Baccarani M., Morra E.; International STI571 CML Study Group. - *Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia*. - N Engl J Med. 2002; 346:645-52.

Kantarjian H., Schiffer C., Jones D., Cortes J. - *Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods* - Blood. 2008; 111:1774-80.

Kantarjian H.M., Talpaz M., Cortes J., O'Brien S., Faderl S., Thomas D., Giles F., Rios M.B., Shan J., Arlinghaus R. - *Quantitative polymerase chain reaction monitoring of BCR-ABL during therapy with imatinib mesylate (STI571; gleevec) in chronic-phase chronic myelogenous leukemia* - Clin Cancer Res. 2003; 9:160-6.

Kreuzer K, Saborowski A, Lupberger J, et al. - *Fluorescent 50-exonuclease assay for the absolute quantification of Wilms' tumour gene (WT1) mRNA: implications for monitoring human leukemias* - Br J Haematol 2001;114:313–318.

Lemos, C., Jansen, G. & Peters, G. J. - *Drug transporters: recent advances concerning BCRP and tyrosine kinase inhibitors* - British Journal of Cancer 2008; 98:857-862.

Li Y, Wang J, Li X, Jia Y, Huai L, He K, Yu P, Wang M, Xing H, Rao Q, et al. - *Role of the Wilms' tumor 1 gene in the aberrant biological behavior of leukemic cells and the related mechanisms* -Oncol Rep 2014; 32: 2680-2686.

Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. - *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR* – Methods 2001; 25:402-408.

Lomaia E.G., Martinkevich I.S., Ogorodnikova Y.S., Lyschov A.A., Bogdanov K.V. -b2a2 type bcr-abl transcript Chronic Myelogenous Leukemia (CML) patients in chronic Phase (CP) on Glivec achieve Complete Cytogenetic Remission (CCyR) earlier than those with b3a2 - Blood 2006; 108(Suppl.):abstract 4780

Mahadevan, D. & List, A. F. - *Targeting the multidrug resistance-1 transporter in AML: molecular regulation and therapeutic strategies* - Blood 2004; 104:1940-1951.

Mahon F.X., Deininger M.W., Schultheis B., Chabrol J., Reiffers J., Goldman J.M., Melo J.V. - *Selection and characterization of Bcr-Abl positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571:diverse mechanisms of resistance* - Blood. 2000; 96:1070-1079.

Mahon, F. X. et al. - *MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models* - Blood 2003; 101(6):2368-2373.

Mahon F. X. and Etienne G. - *Deep Molecular Response In Chronich Myeloid Leukemia: The New Goal Of Theraphy?* - Clin. Cancer Res, 2014; 20(2).

Melo J.V., Deininger M.W. - *Biology of chronic myelogenous leukemia--signaling pathways of initiation and transformation* - Hematol Oncol Clin North Am. 2004; 18:545-68

Melo J.V., Hughes T.P., Apperley J.F. - *Chronic myeloid leukaemia* - Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2003:132-52.

Nestal de Morales, G. et al. - *The interface between BCR-ABL-Dependent and-Indipendent resistance signaling pathways in Chronic Myeloid Leukemia* - Leukemia Research and Treatment 2012.

Nowell P.C., Hungerford D.A. - *Chromosome studies in human leukemia. II. Chronic granulocytic leukaemia* - J Nat Cancer Inst. 1961; 27:1013-35.

Otahalova E, Ullmannova-Benson V, Klamova H, Haskovec C. - *WT1 expression in peripheral leukocytes of patients with chronic myeloid leukemia serves for the prediction of imatinib resistance* - Neoplasma 2009;56:393–397.

Passweg J.R., Walker I., Sobocinski K.A., Klein J.P., Horowitz M.M., Giralt S.A. - *Validation and extension of the EBMT Risk Score for patients with chronic myeloid leukaemia receiving allogeneic haematopoietic stem cell transplants*. - Br J Haematol. 2004; 125:613-620.

Perrotti D., Jamieson C., Goldman J., Skorski T. - *Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation* - J Clin Invest. 2010; 120:2254-64.

Pfirschmann M., Baccarani M., Saussele S., Guilhot J., Cervantes F., Ossenkoppele G., Hoffmann V.S., Castagnetti F., Hasford J., Hehlmann R., Simonsson B. - *Prognosis of long-term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia* - Leukemia. 2016 Jan;30(1):48-56.

Pfirschmann M., Evtimova D., Saussele S., Castagnetti F., Cervantes F., Janssen J., Hoffmann V.S., Gugliotta G., Hehlmann R., Hochhaus A., Hasford J., Baccarani M. - *No influence of BCR-ABL1 transcript types e13a2 and e14a2 on long-term survival: results in 1494 patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib* - J Cancer Res Clin Oncol. 2017 May;143(5):843-850.

Quintás-Cardama A. et Cortes J. - *Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia* – Blood 2009; 113:1619-1630.

Radich J.P. - *How I monitor residual disease in chronic myeloid leukaemia* - Blood. 2009; 114:3376-81.

Radich J.P. - *Chronic myeloid leukemia 2010: where are we now and where can we go?* - Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2010; 2010:122-8.

Radonic A., Thulke S., Mackay I.M., Landt O., Siegert W., Nitsche A. - *Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR* - Biochemical and Biophysical Research Communications 2004; 313:856-862.

Ren R. - *Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia* - Nat Rev Cancer. 2005; 5:172-83.

Rinaldetti S., Pfirrmann M., Manz K., Guilhot J., Dietz C., Panagiotidis P., Spiess B., Seifarth W., Fabarius A., Müller M., Pagoni M., Dimou M., Dengler J., Waller C.F., Brümmendorf T.H., Herbst R., Burchert A., Janßen C., Goebeler M.E., Jost P.J., Hanzel S., Schafhausen P., Prange-Krex G., Illmer T., Janzen V., Klausmann M., Eckert R., Büschel G., Kiani A., Hofmann W.K., Mahon F.X., Saussele S. - *Effect of ABCG2, OCT1, and ABCB1 (MDR1) Gene Expression on Treatment-Free Remission in a EURO-SKI Subtrial* - Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2018 Apr;18(4):266-271.

Rowley J.D. - *A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia indentified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining* - Nature 1973; 243:290-293.

Savage D.G., Antman K.H. - *Imatinib mesylate-a new oral targeted therapy* - N Engl J Med. 2002; 346:683-93.

Sawyers C.L. - *Chronic myeloid leukaemia* - N Engl J Med. 1999; 340:1330-40.

Sharma P., Kumar L., Mohanty S., Kochupillai V. – *Response to Imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients with variant BCR-ABL fusion transcripts* - Ann Hematol 2010; 89:241-7.

Schnittger S, Bacher U, Kern W, Tschulik C, Weiss T, Haferlach C, Haferlach T. - *RQ-PCR based WT1 expression in comparison to BCR-ABL quantification can predict Philadelphia negative clonal evolution in patients with imatinib-treated chronic myeloid leukaemia* - Br J Haematol, 2009; 146(6):665-668.

Sessions J. - *Chronic myeloid leukemia in 2007* - J Manag Care Pharm. 2007; 13:4-7.

Shet A.S., Jahagirdar B.N., Verfaillie C.M. - *Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression* - Leukemia. 2002; 16:1402-11.

Soverini S., De Benedittis C., Mancini M., Martinelli G. - *Present and future of molecular monitoring in chronic myeloid leukemia* - Br J Haematol. 2016 May;173(3):337-49.

Soverini, S. et al. - *Implications of BCR-ABL1 kinase domain-mediated resistance in chronic myeloid leukemia* - Leukemia Research 2014; 38:10-20.

Svensson E, Vidovic K, Lassen C, et al. - *Deregulation of the Wilms' tumour gene 1 protein (WT1) by BCR-ABL1 mediates resistance to imatinib in human leukemia cells* - Leukemia 2007;21:2485–2494.

Sverre H. & Mitelman F. - *Cancer cytogenetics* - Wiley-Blackwell Ed. 2009.

Talpaz M., Silver R.T., Druker B.J., Goldman J.M., Gambacorti-Passerini C., Guilhot F., Schiffer C.A., Fischer T., Deininger M.W., Lennard A.L., Hochhaus A., Ottmann O.G.,

Gratwohl A., Baccarani M., Stone R., Tura S., Mahon F.X., Fernandes-Reese S., Gathmann I., Capdeville R., Kantarjian H.M., Sawyers C.L. - *Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study* - Blood. 2002; 99:1928-37.

Tarling, E. J., de Aguiar Vallim, T. Q. & Edwards, P. A. - *Role of ABC transporters in lipid transport and human disease* - Trends Endocrinol Metab 2013; 24(7):342-350.

Terezina de Lima L. et al. - *Reduced ABCG2 and increased SLC22A1 mRNA expression are associated with imatinib response in chronic myeloid leukemia* - Med Oncol 2014; 31:851.

Tsuboi A, Oka Y, Ogawa H, Elisseeva OA, Tamaki H, Oji Y, Kim EH, Soma T, Tatekawa T, Kawakami M, Kishimoto T, Sugiyama H. - *Constitutive expression of the Wilms' tumor gene WT1 inhibits the differentiation of myeloid progenitor cells but promotes their proliferation in response to granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)* - Leuk Res. 1999 May;23(5):499-505.

Uzunel M, Ringdén O. - *Poor correlation of kinetics between BCR-ABL and WT1 transcript levels after allogeneic stem cell transplantation* - Bone Marrow Transplant, 2004;33(1):47-52.

van der Velden V.H., Hochhaus A., Cazzaniga G., Szczepanski T., Gabert J., van Dongen J.J. - *Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects.* - Leukemia 2003; 17:1013-1034.

Van Dijk JP, Knops GH, Van De Locht LT, Menke AL, Jansen JH, Mensink EJ, Raymakers RA, De Witte T - *Abnormal WT1 expression in the CD34-negative compartment in myelodysplastic bone marrow* - Br J Haematol. 2002; 118(4):1027-33.

van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Díaz MG, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A. - *Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia* - Leukemia. 1999 Dec;13(12):1901-28.

Vega-Ruiz A, Kantarjian H, Shan J, et al. - *Better molecular response to imatinib for patients (pts) with chronic myeloid leukemia (CML) in chronic phase (CP) carrying the b3a2 transcript compared to b2a2 [abstract]* - Blood. 2007;110(11). Abstract 1939.

Villar, V. H. et al. - *Nilotinib counteracts P-Glycoprotein-mediated multidrug resistance and synergizes the antitumoral effect of doxorubicin in soft tissue sarcomas* - Plos One 2012; 7(5):e37735.

von Bubnoff N., Duyster J. - *Chronic myelogenous leukemia: treatment and monitoring* - Dtsch Arztebl Int. 2010; 107:114-21.

Wagner KD, Cherfils-Vicini J, Hosen N, Hohenstein P, Gilson E, Hastie ND, et al. - *The Wilms' tumour suppressor Wt1 is a major regulator of tumour angiogenesis and progression* - Nat Commun. 2014;5:5852.

Wang Y, Thomas A, Lau C, Rajan A, Zhu Y, Killian JK, et al. - *Mutations of epigenetic regulatory genes are common in thymic carcinomas* - Sci Rep. 2014; 4:7336.

Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, Minden MD - *A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story* - Leukemia 2007; 21(5):868-76.

Zhang L., Li Y., Li X., Zhang Q., Qiu S., et al. - *Regulation of HtrA2 on WT1 gene expression under imatinib stimulation and its effects on the cell biology of K562 cells* - oncology letters 14: 3862-3868, 2017

Ringraziamenti

Desidero ringraziare il Professor Renato Fanin e la Prof.ssa Daniela Damiani per avermi permesso di realizzare il mio progetto di dottorato presso il laboratorio della Clinica Ematologica di Udine.

Ringrazio sentitamente la Dottoressa Eleonora Toffoletti e il Dottor Mario Tiribelli che mi hanno supportato e aiutato nella stesura di questo lavoro.

Ringrazio di cuore Alessia per le numerose ore dedicate alla mia tesi e in particolare per i suoi preziosi insegnamenti, per la pazienza e il supporto datomi.

Ci tengo inoltre a ringraziare Angela, Margherita, Sara e Marina per la loro disponibilità, la loro simpatia e per avermi accolto.

Desidero ringraziare con grande affetto i miei genitori e mia sorella per avermi sostenuta e spronata nei momenti di difficoltà.

Ringrazio Arianna, Catte e Leonardo per aver sempre creduto in me e per essere una seconda famiglia.

Vorrei esprimere la mia più sincera gratitudine agli amici: Lavinia, Matteo, Barzo, Marco, Francesca, Alessandra e Sara perché hanno portato allegria e mi hanno sostenuto nei momenti complicati di questo percorso formativo.

Infine, un ringraziamento a Serenella e a mia nonna Giovanna, i miei angeli custodi che da lassù hanno vegliato su di me.